

설편평세포암종의 예후인자로서
nonsteroidal anti-inflammatory
drug-activated gene
(NAG-1)의 발현

연세대학교 대학원

의 학 과

윤 현 철

설편평세포암종의 예후인자로서
nonsteroidal anti-inflammatory
drug-activated gene
(NAG-1)의 발현

지도교수 김 경 수

이 논문을 석사 학위 논문으로 제출함

2006년 6월 일

연세대학교 대학원

의 학 과

윤 현 철

윤현철의 석사 학위논문을 인준함

심사위원 _____ 인

심사위원 _____ 인

심사위원 _____ 인

연세대학교 대학원

2006년 6월 일

감사의 글

본 논문을 완성하기까지 자상한 지도 편달을 아끼지 않으신 김경수 교수님께 진심으로 감사드립니다.

또한, 바쁘신 가운데도 많은 관심을 가지고 연구기간 중 여러모로 조언하여 주신 이수곤 교수님, 최은창 교수님께 감사드립니다. 아울러 이번 연구를 여러 모로 도와 주신 이정권 교수님의 모든 교실원 및 의국원 여러분과 연구원들께 감사의 뜻을 전합니다.

끝으로 항상 물심양면으로 많은 도움을 주시는 부모님과 이 논문이 완성되기까지 격려해주고 내조해준 아내에게 고마운 마음을 전하며, 논문을 완성한 기쁨을 아내 뱃속의 아기 바다와 함께 나누고 싶습니다.

2006년 6월

저자 씀

차례

국문요약	1
I. 서론	2
II. 대상 및 방법	4
1. 대상	4
2. 면역조직화학염색	4
3. 염색반응의 점수화	5
4. 분석 방법	5
III. 결과	6
1. 의무기록과 병리기록 분석	6
2. 정상과 암종 조직에서 NAG-1의 발현	7
3. NAG-1 발현과 임상-병리학적 연관성(clinicopathologic correlation).....	9
4. NAG-1 발현과 예후와의 연관성	11
5. NAG-1 발현과 5년 생존율의 관계	12
IV. 고찰	14
V. 결론	16
참고문헌	17
영문요약	21

그림 차례

Fig. 1. Expression of NAG-1 in normal and oral cavity cancer tissues.....	8
Fig. 2. Distribution of H-scores for NAG-1 in normal and oral cavity cancer tissues.....	9
Fig. 3. NAG-1 expression in good and poor prognosis.	12
Fig. 4. Kaplan-Meier 5-year survival curves according to the expression of higher NAG-1 expression in cancer tissues than normal tissues.	13

표 차례

Table 1. Characteristics of patients and NAG-1 expression	7
---	---

Table 2. Clinicopathologic correlation of NAG-1 expression	10
--	----

국문요약

설편평세포암종의 예후인자로서 nonsteroidal anti-inflammatory drug-activated gene (NAG-1)의 발현

Nonsteroidal anti-inflammatory drug-activated gene (NAG-1)은 여러 암종 세포주에서 세포고사(apoptosis)를 유도하는 유전자이다. 하지만 구강암종의 경우, 암종과 정상조직에서의 NAG-1 발현은 아직 연구된 바가 없다. 이에 구강암종 환자의 정상 조직과 암 조직에서 NAG-1 발현을 알아보고, NAG-1의 발현과 암종의 예후 간의 상관 관계를 보아 NAG-1이 구강암종에 대해 예후인자로서 가치가 있는 가를 알고자 하였다. 설편평세포암종으로 진단되어 일차 치료로 수술을 받은 42명의 환자를 대상으로 의무기록지와 병리기록지 등을 조사하였고 조직 표본으로 획득한 각 환자의 정상-암종 조직에 대해 면역조직화학염색을 하고 H-score를 구하였다. 결과로 암종 조직에서 정상 조직보다 유의하게 NAG-1 발현이 증가하였다. 설 암종 조직에서 NAG-1의 발현은 조직내 침습이 심한 경우, 림프절 전이가 있는 경우, 예후가 불량한 경우에 유의하게 증가하였다. 5년 생존율은 정상보다 암종 조직에서 NAG-1 발현이 증가된 경우 유의하게 감소하였다. 이상의 결과로 암종에서의 NAG-1 발현이 강할 경우 그 암종의 악성변화를 추측할 수 있어 암종의 예후를 알 수 있으므로 암종의 예후인자로서 NAG-1이 유용하다 하겠다.

핵심되는 말 : nonsteroidal anti-inflammatory drug-activated gene, 구강암, 세포고사

설편평세포암종의 예후인자로서 nonsteroidal anti-inflammatory drug-activated gene (NAG-1)의 발현

<지도교수 김경수>

연세대학교 대학원 의학과

윤 현 철

I. 서론

Nonsteroidal anti-inflammatory drug-activated gene (NAG-1)은 염기서열 분석상 TGF- β superfamily 사이토카인을 특징짓는 seven-cystein domain과 15-29%의 동일성을 보여 TGF- β superfamily에 속하는 사이토카인이다.¹ NAG-1은 기존에 알려진 placenta bone morphogenic protein, placenta TGF- β , prostate derived factor, macrophage inhibitory cytokine-1 (MIC-1) 또는 novel TGF- β superfamily HP00269 등의 유전자와 염기서열 분석상 동일한 유전자이다.²⁻⁶ TGF- β superfamily 사이토카인의 일반적인 특성으로 세포의 증식과 고사, 분화, 세포외 기질의 형성 또는 면역 억제와 관련이 있다고 알려져 있으며, 강력한 성장 억제를 일으켜 세포주기를 G1 후기에 머물게 하거나, 세포고사를 일으키며 세포 부착물질의 발현에도 작용한다.^{7,8} NAG-1도 이러한 특성을 보이는데 대장암 세포, 폐암 세포, 전립선암 세포와 구강암종 세포 등에서 세포고사를 유도하여 전세포고사적(proapoptotic), 항종양성(antitumorigenic) 기능을 한다.^{1,9-11} NAG-1은 비스테로이드성 소염제외에도 resveratrol, genistein, diallyl disulfide, 5F-203, AHPN 등에 의해서 유도되며, cyclooxygenase-2와 p53 유전자의 존재 여부와 무관하게 유도된다.^{10,12-14} 이처럼

NAG-1은 비스테로이드성 소염제의 항암작용에 중요한 역할을 담당하여 암예방제(chemopreventive agents)로서의 가능성을 보인다.

NAG-1에 대한 연구에서 조직에서의 NAG-1 발현으로, 대장 및 직장암과 폐암 조직의 경우 정상 조직에서 발현이 증가하고 암 조직에서 하향조절(down-regulation)되는 양상을 보인다.^{9, 15} 그러나 위암의 경우 이와 반대로 암 조직에서 발현이 증가하며 암의 침습도(invasiveness)와 상관관계를 갖는다고 한다.¹⁶ 이처럼 NAG-1의 발현이 조직에 따라 상반된 결과를 보이거나 설편평세포암종의 경우 정상과 암 조직에서 NAG-1 발현은 아직 연구된 바가 없다.

구강암 및 인두암은 전체 악성종양의 약 3%를 차지하며, 대부분은 편평세포암으로 이중 67%는 구강에서 발생하는 편평세포암이다.¹⁷ 구강암은 수술요법, 방사선 치료 및 항암요법의 발전에도 불구하고 50% 이하의 장기 생존율과 높은 사망률을 보여 예후가 불량하다.¹⁸ 두경부암에 대한 성공적 치료 이후 직면하게 되는 어려운 문제가 약 10-40%에서 발생하는 이차 원발암이다. 이러한 이차 원발암이 이비인후과 영역의 다른 암보다 상대적으로 많아 예후가 좋지 않다.¹⁹ 그러므로 구강암의 예후를 추측할 수 있는 인자가 있다면 예후가 좋지 않을 경우나 재발 등을 조기에 발견하여 더욱 적극적인 치료를 함으로서 구강암 환자의 생존율을 높이는 데 기여할 수 있을 것이다.

이에 설 편평세포암종 환자의 정상 조직과 암 조직에서 NAG-1 발현을 알아보고, NAG-1의 발현과 암종의 예후 간의 상관관계를 보아 NAG-1이 설암종에 대해 예후인자로서 가치가 있는 가를 알고자 하였다.

II. 대상 및 방법

1. 대상

1992년 7월부터 2000년 4월까지 연세대학교 의과대학 세브란스병원과 영동 세브란스병원에서 설 편평세포암종으로 진단되어 일차 치료로 수술을 받은 설암종 환자 중 사망 시까지 혹은 추적조사가 5년 이상 가능하였던 42명의 환자를 대상으로 하였다. 후향적으로 의무기록지와 병리기록지 등을 조사하여 TNM staging, 암종의 병리적 grading과 침습도 등을 구하였고 환자의 생존 여부와 무병 생존한 기간(tumor-free survival period) 등을 구하였다.

수술 전 환자의 동의를 얻은 다음, 수술 시 절제된 조직을 중성 포르말린에 고정 후 파라핀에 포매하여 면역조직화학 염색에 이용하였다.

2. 면역조직화학염색

파라핀에 포매된 조직은 4 μ m 두께로 절편을 자른 뒤 xylene으로 파라핀을 제거하였다. 내인성 과산화 효소의 억제제를 위해 실온에서 메탄올에 섞인 3% 과산화수소 용액에 10분간 처리한 후, 2% 탈지분유와 0.2% Triton이 함유된 인산완충 식염수(phosphate buffered saline)에서 배양하여 비특이 반응을 억제하였다. 이후의 단계는 Vectastain *Elite* ABC peroxidase kit (Vector Laboratories: Burlingame, CA, USA)로 시행하였다. 실온상태로 인산완충 식염수에 희석된 정상 차단항체(normal blocking antibody)에 20분간 담근 다음, rabbit anti-NAG-1 항체(a generous gift from Dr. Thomas E. Eling: NIEHS, RTP, NC, USA) (1:5,000 농도)에 4 $^{\circ}$ C로 하룻밤 동안 배양하였다. 다음날 절편을 실온에서 5분간 인산완충 식염수로 3회 세척한 뒤 biotinylated goat anti-rabbit IgG 용액에 실온으로 30분간 배양한 다음 3,3'-diaminobenzidine substrate kit (Vector Laboratories)로 발색하였다. 음성 대조군은 일차항체로 rabbit anti-NAG-1 항체 대신 rabbit

IgG (Vector Laboratories)를 사용하여 염색하였다. 염색된 슬라이드는 광학 현미경으로 관찰하였다.

3. 염색 반응의 점수화(scoring)

수술 시 얻은 조직은 암종 외에 safety margin으로 정상 부분이 함께 절제된 조직으로, 동일한 환자의 염색된 슬라이드에서 정상과 암종 조직이 같이 보이는 부분을 찾아 각 부분을 기존에 사용하였던 modified H-score법으로 반정량화(semiquantification) 하여 NAG-1 발현 정도를 구하였다.¹⁵ 방법을 약술하면 40배의 배율로 관찰한 다음 염색 강도를 0(반응이 없음), 1(약한 반응), 2(중간 정도의 반응), 3(강한 반응)으로 수치화하였다. 이후 각 반응 정도에 따라 염색되는 세포의 백분율을 구하여 다음의 공식에 의해 H-score를 구하였다.

$H\text{-score} = (\text{염색 강도 1에 염색되는 세포의 백분율}) + 2 \times (\text{염색 강도 2에 염색되는 세포의 백분율}) + 3 \times (\text{염색 강도 3에 염색되는 세포의 백분율})$. 이 방법으로 H-score를 구한 경우 H-score 0은 전혀 염색이 되지 않는 것을 의미하고, H-score 300은 모든 세포가 염색 강도 3으로 강하게 염색되는 것을 의미한다. 이 H-score를 각 조직에 대해 무작위로 10 군대를 관찰하여 구한 다음 이를 평균 내어 정상과 암종에서의 H-score를 구하였다.

4. 분석 방법

환자의 TNM 병기중 T1과 T2의 암종은 초기암으로, T3와 T4는 진행암으로 구분하였다. 림프절 전이는 전이가 없는 경우(N-)와 전이가 있는 경우(N+)로 분류하였다. 암종의 분화도는 고도분화 암종(well differentiated carcinoma), 중등도분화 암종(moderately differentiated carcinoma), 저분화 암종(poorly differentiated carcinoma) 등으로 구분하였다. 암종이 조직 내로 얼마나 침범하였는가를 나타내는 침습도는 G1 (침습 깊이가 4 mm 이하), G2 (침습 깊이가 4 mm보다 크고 8 mm 이하), G3 (침습 깊이가 8 mm보다 큰 경우) 등으로

구분하였다. 예후는 추적조사 기간인 5년 간 무병 생존하는 경우를 예후가 좋은 경우로, 추적조사 기간 중 또는 5년 이내에 암종으로 사망하거나 국소적 재발이 있는 경우와 원격전이가 있는 경우 등을 예후가 나쁜 경우로 하였다.

통계 방법으로, 매개변수가 둘인 경우에는 Wilcoxon signed rank test를 이용하였고, 매개변수가 셋 이상인 경우는 Kruskal-Wallis test를 이용하여 $p < 0.05$ 인 것을 유의하게 평가하였다. 추적조사를 통해 5년 생존곡선은 Kaplan-Meier법으로 계산하여 작성하였고 생존곡선의 비교는 two-sided log-rank test로 하였다. 모든 통계 처리는 SAS 8.1 통계 프로그램을 이용하였다.

Ⅲ. 결과

1. 의무기록과 병리기록 분석

환자의 평균나이는 55.1세(33세-74세)였고 남자가 25명, 여자가 17명이었다. pTNM stage로 환자의 병기를 구분하였을 때 T1이 11예(10 N0, 1 N2)이었고, T2가 17예(12 N0, 3 N1, 2 N2B)이었으며, T3가 9예(3 N1, 4 N2A, 2 N2B)였고, T4가 5예(1 N0, 1 N1, 2 N2A, 1 N2B)이었다. 림프절에 전이가 없는 N-는 23예, 림프절에 전이가 있는 N+는 19예이었다. 수술적 치료를 초치료로 한 본 연구의 경우 수술 전 검사에서 원격전이는 전 예에서 관찰되지 않았다. 암종의 분화도별로 보면, 고도분화 암종 26예, 중등도분화 암종 10예, 저분화 암종 6예이었다. 암종의 침습도는 G1이 11예, G2가 13예, G3가 18예이었다. 추적조사 기간 중 암종의 재발이 없거나 5년 이상 암종 없이 생존하여 예후가 좋은 경우는 24예이었고, 예후가 불량한 경우는 18예이었다 (Table 1).

Table 1. Characteristics of patients and NAG-1 expression

Case No.	Age	Sex	T stage	N stage	Histologic grade	Invasion grade	H-score		Survival (months)
							Normal	Tumor	
1	53	M	2	0	Mod	3	180	60	50
2	57	M	2	0	Poor	3	50	10	50
3	70	M	1	0	Well	1	70	40	>60
4	63	M	2	0	Well	2	30	10	16
5	48	M	2	0	Well	2	100	100	>60
6	69	F	1	0	Poor	1	0	0	10
7	48	M	2	0	Well	2	0	0	>60
8	33	M	1	0	Well	2	0	0	>60
9	40	M	1	0	Poor	1	0	0	>60
10	56	M	2	2B	Well	2	0	0	>60
11	45	F	2	0	Mod	1	0	0	52
12	46	M	1	0	Mod	1	0	0	51
13	51	F	2	0	Poor	3	0	0	10
14	55	F	1	0	Mod	1	0	0	>60
15	65	F	2	1	Well	1	0	10	50
16	67	F	3	1	Well	3	100	240	21
17	60	M	4	1	Poor	2	0	150	3
18	60	F	3	2A	Mod	2	160	240	8
19	57	M	1	2	Mod	1	80	140	>60
20	50	M	2	0	Well	3	70	100	>60
21	54	F	1	0	Well	2	0	30	>60
22	47	M	3	2A	Well	3	0	160	14
23	74	M	4	2A	Well	3	80	240	30
24	52	M	2	2B	Well	3	0	180	>60
25	63	M	3	1	Well	2	30	180	30
26	61	F	3	2B	Mod	3	0	70	>60
27	61	M	3	1	Well	3	0	50	>60
28	63	F	2	0	Poor	3	50	270	14
29	55	M	4	2A	Well	3	70	220	10
30	59	F	1	0	Well	1	0	10	>60
31	45	M	2	0	Well	1	0	60	>60
32	45	M	1	0	Well	1	0	80	20
33	40	F	2	1	Well	2	0	50	>60
34	68	F	3	2B	Mod	3	0	180	9
35	62	M	3	2A	Mod	2	0	30	40
36	47	M	2	0	Mod	2	0	20	>60
37	59	F	4	0	Well	3	0	10	>60
38	50	F	2	0	Well	3	0	140	>60
39	59	M	3	2A	Well	3	50	200	5
40	63	F	4	2B	Well	3	100	240	6
41	40	F	2	1	Well	2	0	100	>60
42	53	M	1	0	Well	3	0	30	49

2. 정상과 암종 조직에서 NAG-1의 발현

정상 설 상피조직에서 NAG-1의 발현은 매우 약하거나 발현이 되지 않는 양상이었다. 암종 조직에서의 발현은 암세포의 세포질에서 발현이 관찰되었으며 발현강도는 정상 편평 상피세포보다 강하게 발현되었다. 한

편 각 음성대조군에서는 반응이 관찰되지 않았다 (Fig. 1). 이러한 발현은 전례에서 일정하지 않고 개체에 따라 반응이 없거나 반응이 강한 등의 다양한 양상을 보였다.

42예의 조직을 면역조직화학염색을 하여 관찰한 NAG-1의 H-score는 정상조직에서 32.3 ± 26.7 (평균 \pm 표준편차), 암종 조직에서 104.7 ± 88.0 으로 나와 암종 조직에서 통계적으로 유의하게 NAG-1 발현이 증가하였다 ($p < 0.05$)(Fig. 2).

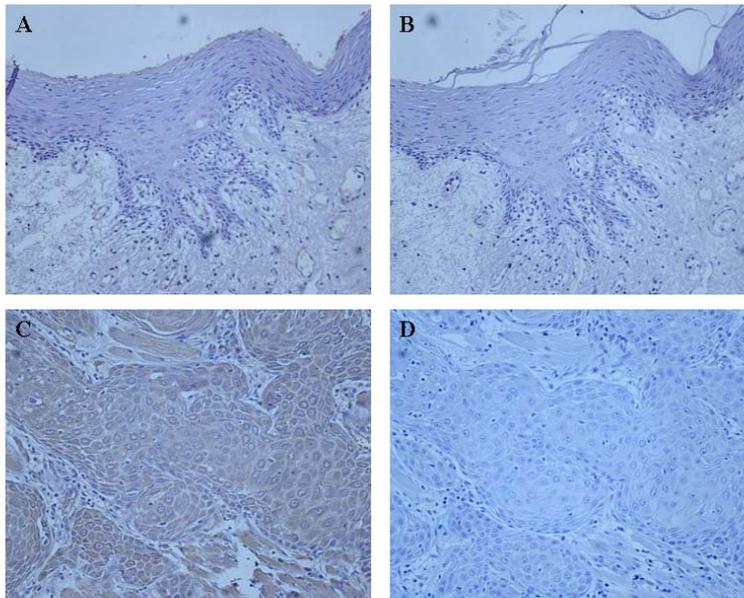


Fig. 1. Expression of NAG-1 in normal and oral cavity cancer tissue. In normal tissue, the expression of NAG-1 is not observed (A). In cancer tissue, its expression is noted in the cytoplasm of cells and the intensity of immunoreactivity of cancer tissue is higher than that of normal tissue (C). In the negative controls of normal (B) and cancer tissue (D), the immunoreactivity is not observed. Original magnification: A, B: x100, C, D: x200.

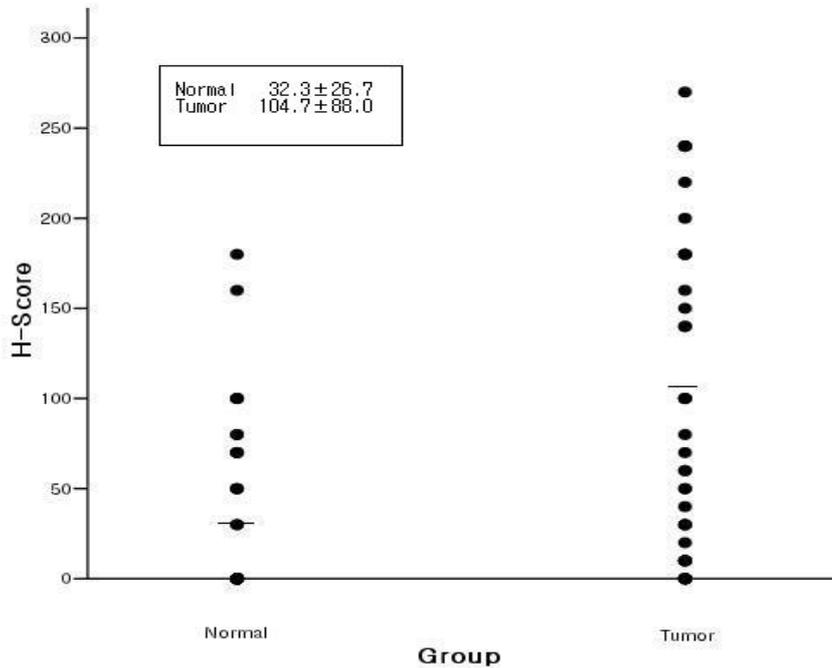


Fig 2. Distribution of H-scores for NAG-1 in normal and oral cavity cancer tissues. The bars in the graph represent the mean value of H-score. The mean H-score of normal tissue is 32.3 and that of tumor is 104.7. The significant difference is noted between H-scores of normal and oral cavity cancer tissues ($p<0.05$).

3. NAG-1 발현과 임상-병리학적 연관성(clinicopathologic correlation)

초기암종에서 NAG-1의 H-score는 암종 51.43 ± 66.9 였고 진행암종에서 H-score는 157.9 ± 83.8 로 초기암종에 비해 진행암종에서 유의하게 NAG-1이 강하게 발현되었다 ($p<0.05$).

림프절 전이에 따른 NAG-1의 발현을 보면 림프절 전이가 없는 N-인 경우 암종의 H-score는 42.2 ± 63.7 이었고 림프절 전이가 있는 N+의

경우 암종의 H-score는 141.1±83.9로 나와 림프절 전이가 있는 예에서 유의하게 NAG-1 발현이 증가하였다 ($p<0.05$).

암종의 분화도에 따라 분류한 경우 고도분화 암종에서의 NAG-1은 95.4±85.7, 중등도분화 암종의 NAG-1은 74.0±84.7, 저분화 암종의 NAG-1은 71.7±113.7로 나와 세 군 간에 유의한 차이를 보이지 않았다.

암종의 침습도와 NAG-1 발현과의 관계를 보면 G1 암종에서의 NAG-1 발현은 30.9±45.7이었고, G2 암종에서는 70.0±78.3, G3 암종의 경우 133.3±92.7이 나와 G3 암종에서 다른 암종에 비해 NAG-1 발현이 유의하게 증가한 소견을 보였다 ($p<0.05$)(Table 2).

Table 2. Clinicopathologic correlation of NAG-1 expression

Clinicopathologic factors	n	H-score of tumor(mean)	Significance
Pathologic T stage			0.008 ^{a*}
1, 2(early)	28	51.4	
3, 4(advanced)	14	157.9	
Nodal metastasis			0.005 ^{a*}
N(+)	19	141.1	
N(-)	23	42.2	
Tumor differentiation			0.415 ^b
Well	26	95.4	
Moderately	10	74.0	
Poorly	6	71.7	
Invasion grade			0.039 ^{b*}
1	10	30.9	
2	13	70.0	
3	19	133.3	
Prognosis			0.005 ^{a*}
Good	24	48.3	
Poor	18	138.3	

^a:Wilcox Two-Sample Test

^b:Kruskal-Wallis Test

* $p<0.05$

이상의 결과로 설 암종에서 NAG-1의 발현은 암종이 진행암이고 림

프절 전이가 있으며 조직내로 침습이 심할 경우 발현이 강한 것을 알 수 있었다.

4. NAG-1 발현과 예후와의 연관성

설 암종 환자에서 일차 치료로 수술을 한 후 추적조사 기간 중 암종의 재발이 없거나 5년 이상 암종 없이 생존하여 예후가 좋은 암종에서의 NAG-1 발현의 H-score는 48.3 ± 32.9 이었고, 추적조사 기간 중 또는 5년 이내에 암종으로 사망하거나 국소적 재발이 있는 경우와 원격전이가 있어 예후가 불량한 암종에서의 NAG-1 발현은 138.3 ± 100.0 으로 나와 예후가 불량한 암종에서의 발현이 유의하게 증가하였다 ($p < 0.05$)(Table 2)(Fig. 3).

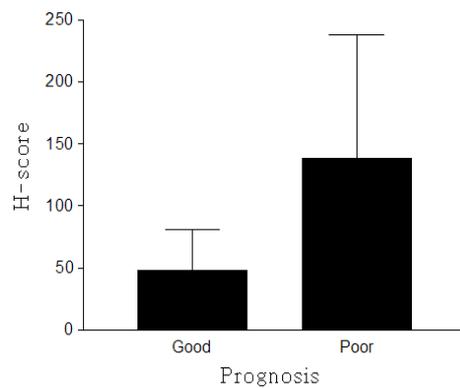
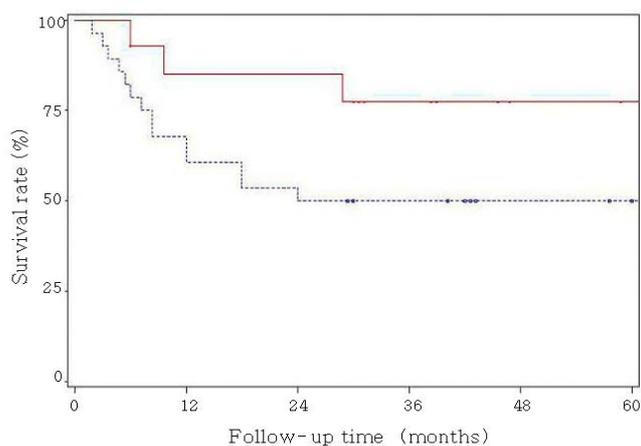


Fig. 3. NAG-1 expression in good and poor prognosis. The mean H-score of good prognosis group is 48.3 and that of poor prognosis group is 138.3. In the poor prognosis group, the

H-score of NAG-1 is significantly higher than that of good prognosis group ($p < 0.05$).

5. NAG-1 발현과 5년 생존율의 관계

NAG-1 발현 정도에 따라, 정상과 암중에서의 NAG-1 발현정도가 같거나 정상에서 NAG-1 발현이 암중보다 강한 군($N \geq T$, group 1), 암중에서의 NAG-1 발현이 정상보다 강한 군($N < T$, group 2) 등의 두 군으로 구분하여 구강암종 환자의 5년 생존율 곡선을 작성하였다. 생존곡선에서 보면 group 1에서의 생존율이 group 2에서의 생존율보다 유의하게 높았다 ($p < 0.05$)(Fig. 4).



- ⋯ H-score: Normal < Cancer
- H-score: Normal \geq Cancer

Fig. 4. Kaplan-Meier 5-year survival curves according to the expression of NAG-1. In the cases of higher NAG-1 expression in cancer tissues than normal tissues, 5-year survival is significantly

lower than other cases ($p < 0.05$).

이러한 결과로 설 암종 조직에서의 NAG-1 발현이 정상 조직보다 강한 예가 그렇지 않은 예와 비교시 5년 생존율이 낮다는 것을 알 수 있었다.

IV. 고찰

NAG-1에 대한 면역조직화학염색 결과 정상 설 상피조직의 NAG-1 발현은 기저세포에서 발현되고 설 표면으로 올라가면서 발현이 감소하여 각질층에서는 발현되지 않는 양상이었다. 대장과 폐의 정상 상피조직의 경우 기저세포에서는 NAG-1이 발현되지 않고 세포고사가 진행되는 조직표면의 상피세포에서 발현이 되어 설 조직과는 상반된 발현을 보인다.^{9,15} 이처럼 상반된 발현을 보이는 이유로 정상 설 조직은 편평 상피세포이고 정상 대장과 폐 조직은 원주 상피세포인 조직학적 상이성에 의한 것으로 생각된다. NAG-1 발현이 조직 발현형(phenotype)의 변화에 따라 차이를 보이는 예로 정상 코점막 상피세포와 이의 편평화생(squamous metaplasia)을 들 수 있는데, 정상 코점막 상피세포에서는 NAG-1이 강하게 발현되나 편평화생 조직에서는 NAG-1이 매우 약하게 발현되거나 발현되지 않는 양상을 보여 NAG-1 발현이 조직 발현형에 따라 특이하게 발현함을 의미한다 하겠다.²⁰

본 연구에서 구강암종 조직에서의 NAG-1 발현이 정상조직보다 유의하게 강하게 발현되어, 암종에서 NAG-1 발현이 상향 조절되는 결과를 보였다. 이와 같이 암종 조직에서 NAG-1이 상향 조절되는 경우로 위암 조직에서 정상 위 조직보다 NAG-1 발현이 증가하였고, 전립선암 조직의 면역조직화학염색, microarray, RT-PCR 등의 결과에서도 암종에서 NAG-1의 발현이 상향 조절되어 본 연구결과와 동일한 양상이었다.^{16,21} 반면 대장-직장암의 경우 암종에서 NAG-1 발현이 정상조직보다 약하게 하향 조절되며 *Min* mice의 용종과 정상 조직에 대한 면역조직화학염색에서도 암종에서 NAG-1이 하향 조절되어 본 연구결과와는 상반된 결과였다.¹⁵ 이처럼 조직에 따라 암종과 정상조직의 NAG-1 발현이 상이한 결과를 보이는데 가능한 이유는 각 조직에 따른 특이성으로 생각되며 이에 대해서는 추가연구가 필요하리라 본다.

한편 암종 조직에서의 NAG-1 발현과 암종 세포주에서의 NAG-1 발현은 암종 조직과 세포주에 따라 발현 결과가 일치하기도 하고 일치하지 않는 등의 다양한 결과를 보인다. 대장-직장암종 세포주의 경우 비스테로이드성 소염제에 의해 NAG-1 발현이 조절되며 NAG-1에 의해 세포

고사가 유도된다.¹ 이 경우 세포주에서는 NAG-1에 의해 세포고사가 일어나므로 세포고사가 감소된 상태인 대장-직장암종 조직에서의 NAG-1 발현은 감소하게 되어 세포와 조직 간의 발현이 일치하는 결과를 보인다. 그러나 구강암종 세포주와 전립선암종 세포주의 경우 NAG-1에 의해 세포고사가 유도되지만 암종 조직에서의 발현은 오히려 증가한 상태여서 세포와 암종에서의 발현이 일치하지 않는 결과를 보인다.^{10,21,22} 구강암종과 전립선암종처럼 세포주에서는 세포고사를 유도하나 암종 조직에서의 발현이 증가된 이유의 하나로 NAG-1 단백질의 polymorphism이 가능하다. 즉, 암종세포에서는 세포고사의 유도를 위해 NAG-1 단백질 형성이 증가하나 이러한 단백질이 정상 단백질이 아니고 polymorphism에 의해 변형된 경우 단백질은 증가한 상태로 측정되나 세포고사 기능을 하지 못하는 경우이다. 또 다른 이유로 NAG-1 수용체(receptor)의 변형이다. 아직 NAG-1 수용체가 밝혀지지 않은 상태이나 NAG-1은 일종의 사이토카인이므로 수용체를 통해 신호전달이 일어나게 된다. 만약 암종 세포의 수용체가 변화되어 정상적인 작용을 하지 못한다면 세포고사 작용을 하는 신호가 적은 것으로 인지되어 autocrine 혹은 paracrine action의 NAG-1 형성이 증가하므로 결국 조직에서의 발현이 증가하게 된다. 과연 어떤 기전으로 세포에서의 발현과 조직에서의 발현이 상이한지에 대해서는 NAG-1 단백질의 polymorphism과 수용체에 대한 연구가 추가적으로 필요하다고 생각한다.

설암은 다른 두경부 편평세포암종과 마찬가지로 암종의 크기, 침범부위 및 전이여부와 같은 임상적 병기가 중요한 예후 인자로 알려져 있으며, 특히 암종의 침습 정도는 생존율과도 밀접한 연관성이 있다고 보고되고 있다. 최근에는 이러한 임상적 인자들 외에 종양세포의 객관적 생물학적 표지자에 대한 관심이 높아지고 있다.^{19,23} 본 연구에서 설편평세포암의 여러 예후 인자들과 NAG-1의 발현과의 상관관계를 분석한 결과 진행된 설암의 병기, 림프절 전이가 있는 경우, 조직내 침습 정도가 심한 경우에 NAG-1 발현이 증가하였다. 따라서 NAG-1 발현에 따라 설암의 진행과 전이 정도를 예측할 수 있을 것으로 사료되며 이는 위암종과 전립선암종에서도 유사한 결과가 관찰된다.^{16,21} 또한 대장암종, 양성 용종, 그리고 정상에서 혈청내 NAG-1 수치를 비교한 결과 암종에서 NAG-1

이 증가하여 혈청내 NAG-1 수치가 높을수록 대장암의 진행과 연관성이 높다고 하여 본 연구결과와 일치하므로 NAG-1의 예후인자로서의 가능성을 뒷받침한다 하겠다.²⁴ 연구결과에서 일차치료로 수술을 받은 후 재발 및 전이가 있거나 5년 미만으로 생존한 경우를 예후가 나쁜 군으로 정의하고 NAG-1과의 연관성을 분석한 결과, 예후가 나쁜 군에서는 정상조직보다 설암종에서의 NAG-1 발현이 강한 것을 알 수 있었다. 또한 Kaplan-Meier 방법을 이용하여 분석한 결과 암종에서의 NAG-1 발현이 정상조직의 발현보다 강한 경우에 유의하게 생존기간이 감소하는 결과를 보였다. 이러한 결과를 토대로 보면 설암종의 경우 절제된 조직에 대한 조직화학염색을 통해 NAG-1의 발현을 분석하여 암종의 진행 및 침습 정도를 예측할 수 있을 뿐만 아니라 암종과 정상조직을 비교하여 암종에서의 NAG-1 발현이 강한 경우 예후가 좋지 않다는 것을 예측할 수 있으므로 암종의 예후인자로서 NAG-1이 유용하다 하겠다. 추후 환자의 혈청에서 이러한 결과를 추측할 수 있는 ELISA 방법이 개발되면 임상적으로 더욱 간편하게 예후를 추측할 수 있으리라 생각한다.

V. 결론

설 편평상피암종 환자의 암종 조직과 정상 조직에 대한 NAG-1의 발현을 면역조직화학염색으로 알아보고 예후인자들과 환자의 생존율을 비교분석한 결과, NAG-1 발현정도를 통해 암종의 진행 및 침습정도를 예측할 수 있으며 정상 조직보다 암종에서의 NAG-1 발현이 강할 경우 생존율이 의미있게 낮았으므로 설암종의 예후인자로서 NAG-1이 유용하다는 것을 알 수 있었다.

참고문헌

- 1) Baek SJ, Kim KS, Nixon JB, Wilson LC, Eling TE. Cyclooxygenase regulate the expression of a TGF- β superfamily member that has proapoptotic and antitumorigenic activities. *Mol Pharmacol* 2001; 59: 901-908.
- 2) Hromas R, Hufford M, Sutton J, Xu D, Li Y, Lu L. PLAB, a novel placental bone morphogenetic protein. *Biochem Biophys Acta* 1997; 1354: 40-44.
- 3) Lawton LN, Bonaldo MF, Jelenc PC, Qiu L, Baumes SA, Marcelino RA, et al. Identification of a novel member of the TGF- β superfamily highly expressed in human placenta. *Gene* 1997; 203: 17-26.
- 4) Paralkar VM, Vail AL, Grasser WA, Brown TA, Xu H, Vukicevic S, et al. Cloning and characterization of a novel member of the transforming growth factor- β /bone morphogenetic protein family. *J Biol Chem* 1998; 273: 13760-13767.
- 5) Bootcov MR, Bauskin AR, Malenzuela SM, Moore AG, Bansal M, He XY, et al. MIC-1, a novel macrophage inhibitory cytokine, is a divergent member of the TGF- β superfamily. *Proc Natl Acad Sci* 1997; 94: 11514-11519.
- 6) Yokoyama-Kobayashi M, Saiki M, Sekine S, Kato S. Human cDNA encoding a novel TGF- β superfamily protein highly expressed in placenta. *J Biochem* 1997; 122: 622-626.
- 7) Schwarte-Waldhoff I, Klein S, Blass-Kampmann S, Hintelmann A, Eilert C, Drescher S, et al. DPC4/SMAD4 mediated tumor suppression of colon carcinoma cells is associated with reduced urokinase expression. *Oncogene*

- 1999; 18: 3152-3158.
- 8) Markowitz SD, Roberts AB. Tumor suppressor activity of the TGF- β pathway in human cancers. *Cytokine Growth Factor Rev* 1996; 7: 93-102.
 - 9) Newman D, Sakaue M, Koo JS, Kim KS, Baek SJ, Eling T, et al. Differential regulation of nonsteroidal anti-inflammatory drug-activated gene in normal human tracheobronchial epithelial and lung carcinoma cells by retinoids. *Mol Pharmacol*. 2003 Mar; 63(3): 557-564.
 - 10) Baek SJ, Wilson LC, Lee CH, Eling TE. Dual function of nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs): Inhibition of cyclooxygenase and induction of NSAID-activated gene. *J Pharmacol Exp Ther* 2002; 301: 1126-1131.
 - 11) Kim KS, Yoon JH, Kim JK, Baek SJ, Eling TE, Lee WJ, et al. Cyclooxygenase inhibitors induce apoptosis in oral cavity cancer cells by increased expression of nonsteroidal anti-inflammatory drug-activated gene. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004 Dec 24; 325(4): 1298-1303.
 - 12) Tan M, Wang Y, Guan K, Sun Y. PTGF- β a type β transforming growth factor (TGF- β) superfamily member, is a p53 target gene that inhibits tumor cell growth via TGF- β signaling pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97: 109-114.
 - 13) Wilson LC, Baek SJ, Call A, Eling TE. Nonsteroidal anti-inflammatory drug-activated gene (NAG-1) is induced by genistein through the expression of p53 in colorectal cancer cells. *Int J Cancer* 2003; 105: 747-753.
 - 14) Bottone FG, Baek SJ, Nixon JB, Eling TE. Diallyl disulfide (DADS) induces the antitumorigenic NSAID-activated gene (NAG-1) by a p53-dependent mechanism in human colorectal HCT 116 cells. *J Nutr* 2002; 132: 773-778.

- 15) Kim KS, Baek SJ, Flake GP, Loftin CD, Calvo BF, Eling TE. Expression and regulation of nonsteroidal anti-inflammatory drug-activated gene (NAG-1) in human and mouse tissue. *Gastroenterology* 2002; 122: 1388-1398.
- 16) Lee DH, Yang Y, Lee SJ, Kim KY, Koo TH, Shin SM, et al. Macrophage inhibitory cytokine-1 induces the invasiveness of gastric cancer cells by up-regulating the urokinase-type plasminogen activator system. *Cancer Res* 2003; 63: 4648-4655.
- 17) Canto MT, Devesa SS. Oral cavity and pharynx cancer incidence rates in the United States, 1975-1998. *Oral Oncol* 2002; 38: 610-617.
- 18) Mork J. Forty years of monitoring head and neck cancer in Norway-no good news. *Anticancer Res* 1998; 18: 3705-3708.
- 19) Levine PA, Hood RJ. Neoplasms of the oral cavity. In: Johnson JT, Gluckman JL, Pou AM, editors. *Head and neck surgery-Otolaryngology*. 3rd ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins;2001. p.1311-1325.
- 20) 김경수, 김창훈, 신지현, 김선구, 김정홍, 윤주현. 사람 코점막과 배양된 코점막 상피세포에서 nonsteroidal anti-inflammatory drug-activated gene-1(NAG-1)의 발현. *대한이비인후과학회지* 2003; 46: 396-400.
- 21) Nakamura T, Scorilas A, Stephan C, Yousef GM, Kristiansen G, Jung K, et al. Quantitative analysis of macrophage inhibitory cytokine-1 (MIC-1) gene expression in human prostatic tissues. *Br J Cancer* 2003; 88: 1101-1104.
- 22) Liu T, Bauskin AR, Zaunders J, Brown DA, Pankurst S, Russell PJ, et al. Macrophage inhibitory cytokine 1 reduces cell adhesion and induces apoptosis in prostate cancer

- cells. *Cancer Res* 2003; 63: 5034-5040.
- 23) Pich A, Chiusa L, Navone R. Prognostic relevance of cell proliferation in head and neck tumor. *Ann Oncol* 2004; 15: 1319-1329.
- 24) Brown DA, Ward RL, Buckhaults P, Liu T, Romans KE, Hawkins NJ, et al. MIC-1 serum level and genotype: associations with progress and prognosis of colorectal carcinoma. *Clin Cancer Res* 2003; 9: 2642-2650.

Abstract

Expression of nonsteroidal anti-inflammatory drug-activated gene (NAG-1) as a prognostic marker in oral cavity carcinoma

Hyun Chul Yoon

*Department of Medicine
The Graduate School, Yonsei University*

(Directed by Professor Kyung-Su Kim)

Nonsteroidal anti-inflammatory drug-activated gene (NAG-1) induces apoptosis in oral cavity cancer cells. However, its expression in oral cavity cancer and normal tissues has not been studied. The aim of this study was to investigate the expression of NAG-1 in oral cavity cancer and normal tissues and to identify the relationship between NAG-1 expression and the prognosis of oral cavity cancer patients in order to determine whether NAG-1 can be used as a valuable prognostic factor in oral cavity cancer.

The medical records and pathologic reports of 42 oral cavity cancer patients who received surgery as the primary treatment were surveyed. Oral cavity cancer and normal tissues, which were obtained during the operation, were stained with anti-NAG-1 antibody using the immunohistochemical method and H-score was calculated.

As a result, higher expression of NAG-1 was observed in the cancer tissues than in the normal tissues. NAG-1 expression was noted to be higher in cases of oral cavity cancers with more invasion, positive lymph node metastasis, and poor prognosis. 5 year survival rate was significantly decreased in cases showing

higher NAG-1 expression in the cancer tissues than in the normal tissues.

In summary, higher NAG-1 expression in the cancer tissue suggests malignant change in cancer tissue and poor prognosis. Therefore, NAG-1 may be a useful prognostic marker in oral cavity carcinoma.

Key Words : nonsteroidal anti-inflammatory drug-activated gene, apoptosis, oral cavity cancer