

Functional expression of
chemokine receptors
in gastric cancer

연세대학교 대학원

의 학 과

이 준 호

Functional expression of
chemokine receptors
in gastric cancer

지도교수 노 성 훈

이 논문을 박사학위 논문으로 제출함

2007년 월 일

연세대학교 대학원

의 학 과

이 준 호

이준호의 박사 학위논문을 인준함

심사위원 노 성 훈 인

심사위원 최 승 호 인

심사위원 정 현 철 인

심사위원 김 호 근 인

심사위원 김 종 선 인

연세대학교 대학원

2007년 월 일

감사의 글

이 논문 뿐 아니라 다른 논문을 준비하는 과정에서, 또한 외과의사다운 삶을 살 수 있도록 해주시고 위암을 전공하는 외과의사로서 이 자리에 있을 수 있기까지 부족한 저를 항상 세심한 자애와 열성으로 높은 가르침을 주신 노 성훈 교수님께 평소 하지 못했던 감사의 말씀을 올립니다. 또한 학문적인 것 뿐 아니라 삶에 있어서도 많은 가르침을 주셨으며 귀감이 되 주신 최 승호 교수님께도 감사의 말씀을 드립니다. 학문적 충고와 격려를 아끼지 않으신 김 호근 교수님, 정 현철 교수님, 김 종선교수님께도 감사의 말씀을 드립니다.

늦은 밤까지 나와 함께 항상 같이 하며 실험을 도와준 이 면희 연구원에게도 감사를 표합니다. 이 논문을 준비하는 과정에서 항상 많은 배려를 해주신 국립암센터의 모든 식구들에게도 깊은 감사를 드립니다.

항상 애정으로 염려를 해주시는 부모님, 형님과 동생에게 이 논문이 작은 기쁨이 되었으면 합니다. 늦은 밤 귀가에도 불평 않고 묵묵히 내조를 해준 집사람 리와 사랑하는 아들 원우와 이 기쁨을 나누고 싶습니다.

이 준 호 씀

<차례>

그림 및 표 차례	I
국문요약	V
I. 서론	1
II. 재료 및 방법	5
1. 위암세포주	5
2. RNA 추출과 RT-PCR 분석	5
3. Western blot 분석	5
4. Flow cytometry 분석	6
5. Confocal microscopy	6
6. Immunohistochemistry	6
7. Proliferation assay	7
8. Migration assay	7
9. Tissue microarray	7
가. 대상환자	7
나. Tissue microarray	7
다. 통계분석	8
III. 결과	9
1. Expression of chemokine receptors in cultured gastric cell lines	9
2. Expression of CCR4 in primary gastric cancer tissue	11
3. Expression of CCR4 has no effect on gastric cancer cell proliferation	13
4. Migration assay of gastric cancer cells in response to CCL17	14
5. Tissue microarray	16
가. 대상 환자	16
나. Tissue microarray	18
IV. 고찰	21

V. 결론	25
참고문헌	26
영문요약	33

그림 차례

그림 1. Model of chemokine regulation of breast cancer metastasis · · · · ·	3
그림 2. mRNA expression of chemokine receptors in stomach cancer cell line · · · · ·	9
그림 3a. RT-PCR result of CCR4 in gastric cancer cell lines · · · · · ·	10
그림 3b. Western blot result of CCR4 in gastric cancer cell lines · · · · ·	10
그림 3a. FACS result of CCR4 in gastric cancer cell lines · · · · · · · · ·	10
그림 4a. Immunohistochemistry result of CCR4 in primary gastric cancer tissue · · · · ·	11
그림 4b. Confocal microscopy of gastric cancer cell for actin · · · · · ·	12
그림 4c. Confocal microscopy of gastric cancer cell for CCR4 · · · · · ·	13
그림 5. Proliferation assay of CCR4-positive gastric cancer cell s · · · · ·	14
그림 6a. Migration assay of CCR4-positive gastric cancer cells · · · · · ·	15
그림 6b. Migration of SNU216 cells responding to CCL17 · · · · · · · · ·	15
그림 6c. Inhibition of migration using anti-CCL17 antibody · · · · · · · · ·	16
그림 7. Tissue microarray for CCR4 in gastric cancer tissues · · · · · ·	18

그림 8. Survival curve according to the CCR4 positivity 20

그림 9. Mechanism of angiogenesis via chemokine receptor 22

표 차례

표 1. Examples in chemokine receptor expression in cancers 4

표 2. 대상 환자의 임상병리학적 특성 16

표 3. 모든 위암환자에서 CCR4 양성율에 따른 재발의 차이 18

표 4. 진행성 위암환자에서 CCR4 양성율에 따른 재발의 차이 19

표 5. 진행성 위암환자에서 재발의 위험인자에 대한 로지스틱 회귀분석 결과 19

국문요약

Functional expression of chemokine receptors in gastric cancer

최근 키모카인과 키모카인 수용체의 작용이 암의 전이와 관련 있다는 일련의 보고들이 있어왔다. 본 연구에서는 여러 종류의 키모카인 수용체 중 암의 전이와 관련이 있는 것으로 보고된바 있는 CC, CXC 키모카인 수용체들이 다양한 위암세포주들에서 RT-PCR 방법을 이용하여 표현되는지를 확인한 결과 CCR4, CCR6, CCR10, CXCR4 등이 흔하게 발현됨을 확인하였고 이 들 중 기존에 고형암에서 보고된 바가 없는 CCR4를 이용하여 이는 western blot과 FACS 등을 통해 단백질 수준에서도 표현됨을 확인하였다. CCR4가 실제 위암세포와 조직에서 어떠한 형태로 분포하는지 알아보기 위해 면역조직화학염색을 통해 세포막에 존재하는 것을 확인하였고 이들 CCR4 수용체가 실제로 작용하는지를 알아보기 위해 그 리간드인 CCL17을 이용하여 migration assay, migration inhibition assay, proliferation assay, confocal microscopy 등을 시행한 결과 CCR4가 위암의 증식과 무관하게 위암세포의 운동에 관여하며 이러한 운동능력은 리간드의 억제에 반응하여 운동능력 또한 저하됨을 관찰하였다. 임상적으로 CCR4의 발현이 어떠한 의의를 갖는지 알아보기 위해 tissue microarray를 해 본 결과 위암조직에서의 CCR4 발현율이 환자의 연령이나 성 또는 조직학적 분화 등과는 관계없이 위암의 전이와 상관관계가 있으며 이러한 연관성은 다변량 분석에서도 동일한 결과를 얻을 수 있었다. 이러한 연구결과들에 기초하여 CCR4가 위암에서 과발현되며 임상적으로는 전이와 상관관계가 있어 CCR4를 억제함으로써 위암의 전이를 억제할 수 있는 가능성을 제시하였다.

핵심되는 말 : 위암, 전이, 키모카인

Functional expression of chemokine receptors in gastric cancer

<지도교수 노성훈>

연세대학교 대학원 의학과

이 준 호

I. 서론

위암은 한국에서 가장 흔한 암이다. 2000년 통계에 따르면 인구 10만 명당 남자는 69.6명, 여자는 26.8명이 매년 발병하는 것으로 보고되고 있다.¹ 최근 조기진단의 증가, 수술 기법이나 항암화학요법제의 개발 등으로 생존율이 점차 향상되고 있으나 여전히 한국에서 발생률 1위, 사망률 2위인 암이다.²⁻⁴ 이렇게 위암환자의 사망률이 여전히 높은 이유는 암세포가 위로부터 간이나 복막으로 전이가 잘 이루어지며 이러한 전이를 효과적으로 치료할 만한 수단이 아직 없기 때문이다.⁵⁻⁷

전이는 암의 성장, 신생혈관생성, 기저막 침투, 원발암으로부터 암의 탈락, 림프관이나 혈관으로의 침투, 전신순환, 2차 기관에서 혈관으로부터 탈출, 전이된 기관에서의 성장 등 일련의 과정을 통해 이루어진다.⁸ 이러한 암의 전이는 매우 조직적이고 기관특이적인 특성을 갖게 된다.⁹ 예를 들어 유방암의 경우는 주로 림프절, 폐나, 뼈, 간 등으로 전이가 되는 반면 대장암의 경우는 림프절과 간전이 대부분이다.

위암의 경우, 다른 소화기암과 마찬가지로 간전이가 빈번하지만 원위림프절과 복막전이가 더욱 흔한 전이의 형태다.¹⁰ 위암의 경우에도 다른 암과 마찬가지로 MMP나 VEGF 등 주로 신생혈관생성과 관련 있는 많은 인자들이 위암의 전이에 관여하는 것으로 알려져 있으나 이들은 주로 혈행성 전이를 설명하는 기전들로 앞서 언급한 바와 같이 위암에서 제일 흔한 복막전이나 림프절 전이 등에 대한 연구는 거

의 없는 상황이다.¹¹⁻¹³

암의 기관특이적인 전이현상을 설명하는 기전은 크게 3가지로 구분되는데 첫째는 전이되는 조직에서 분비되는 특정한 성장인자로 암세포가 무작위로 이동되는 과정에서 특정한 성장인자가 분비되는 기관에서만 성장을 할 수 있다는 이론이다.¹⁴ 두 번째는 접합물질이다.¹⁵ 이는 전이되는 조직에 특이한 접합물질을 암세포가 갖고 있어 특정한 조직에 과 반응한다는 이론이다. 마지막 세 번째는 화학적 친화물질이 전이되는 기관에서 분비되어 암세포들이 방향성을 갖고 이동한다는 이론이다. 이러한 다양한 이론 가운데 화학적 친화물질과 관련된 기전을 설명하는 이론의 하나로 키모카인이 알려지게 되었다.¹⁶ 키모카인은 작고 화학적으로 물질을 끌어당기는 역할을 하는 8내지 10kd의 자그마한 단백질로 G 단백질관련 수용체에 결합한다.¹⁷ 현재까지 45개의 리간드와 19개의 수용체가 알려져 있으며 씨스테인의 배열에 따라 CC, CXC, XC₃C, C 키모카인으로 분류를 하며 20내지 70%에서 아미노산 배열이 동일한 것으로 알려져 있다.¹⁸ 키모카인은 원래 염증세포들이 염증이 생긴 부위로 이동하는데 관여하는 것으로 알려져 있으며 이외에도 림프기관의 발달, 세포의 분열, 창상의 회복, 신생혈관 형성 등에도 관여하는 것으로 알려져 있다.¹⁹

염증세포와 마찬가지로 암세포도 키모카인의 조직 간 농도 차에 의해 이동하여 특정한 부위에서 혈관을 빠져나온다는 사실이 최근 밝혀졌다.^{20,21} 이렇게 특정한 기관으로의 이동은 키모카인 수용체가 리간드의 농도 차이에 따라 신호전달체계가 달라진데 기인한다. 리간드의 농도가 낮은 경우에는 heterodimer를 형성하며 이는 주로 세포의 부착 등에 관여하게 되고 리간드의 농도가 높은 경우에는 homodimer를 형성하여 주로 세포의 이동이 일어나게 된다.²² 이 과정에는 selectin이나 integrin 등도 관여하는 것으로 알려져 있다.²³ 유방암의 경우 폐나 간으로 주로 전이가 되는데 이러한 기관들은 CXCL12라는 키모카인이 많이 발현되는 기관이며 유방암세포가 그 수용체인 CXCR4를 갖고 있어 CXCL12를 첨가하는 경우 유방암세포의 운동능력이나 기저막 침투력 등이 현저히 증가하는 것으로 보고된 바 있다.¹⁶ 다양한 방법으로 유방암세포에서 CXCR4가 존재하는 것을 밝혀냈으며 이들

수용체가 단순히 존재하는 것이 아니고 그 리간드인 CXCL12에 의해 유방암세포의 이동을 야기하고 이러한 이동은 양-반응관계를 보여 더 많은 리간드에 의해 더 많이 이동을 함을 보여주었다. 더욱이 동물실험에서 CXCR4에 대한 항체를 투여한 결과 유방암세포의 전이가 억제되는 것으로 보고하였다.

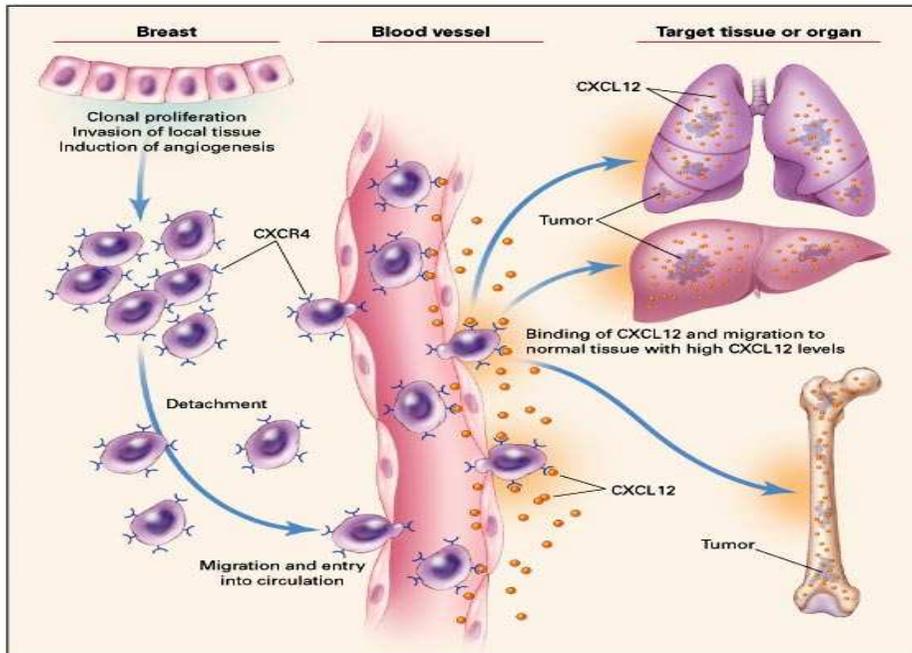


그림 1. Model of chemokine regulation of breast cancer metastasis (Murphy PM. NEJM, 2001;345(11): 833-5)

이러한 키모카인은 유방암 뿐 아니라 대장암이나 전립선 암 등 다양한 암종에서 표현되며 전이와 관련이 있는 것으로 보고되고 있다.²⁴ 주로 CXCR4와 CCR7이 흔하게 표현되는 것으로 알려져 있고 일부 암의 경우 CXCR3, CXCR5, CCR6, CCR10 등이 표현되는 것으로 보고되어 있다. CXCR4의 경우에는 주로 간이나 뼈 전이와 관련이 있는 것으로 보고되어 있고 가장 최근에는 CCR6가 대장암의 간전이와 관련이 있음이 보고되어 있다.²⁵ 위암의 경우 CCR7이 위암세포에 존재하고 기능을 하며 많이 표현되는 경우 림프절 전이를 잘 한다고 알려

져 있다.²⁶ 하지만 임상적으로 림프절 전이보다는 간이나 복막전이보다 더욱 심각한 문제가 되며 이러한 형태의 전이와 관련된 연구는 없다.⁵

표 1. Examples in chemokine receptor expression in cancers

Primary cancer	Metastatic site	Chemokine receptor	Source	Year
Breast cancer	Lung, liver, LN	CXCR4, CCR7	Nature	2001
Ovarian Cancer	peritoneum	CXCR4	CR	2001
Melanoma	LN	CCR7	JNCI	2001
Neuroblastoma	Bone	CXCR4	JI	2001
Gastric cancer	LN	CCR7	CR	2002
Melanoma	Lung	CXCR4	CR	2002
Prostate Cancer	Bone	CXCR4	CR	2002
Colorectal	Liver	CXCR4, CCR6	JCO	2006
ALL	LN	CXCR3, CXCR4	Lue Res	2006
CML	LN	CXCR4, CXCR5, CXCR3	Blood	2004

본 연구에서는 다양한 키모카인 수용체 중에서 암의 전이와 관련이 있는 것으로 보고되고 있는 CC와 CXC 키모카인 수용체들 중에서 위암에서 어떠한 종류가 발현되며 이들의 기능, 위암의 전이와의 관련성을 알아보려고 하였다.

II. 재료 및 방법

1. 위암세포주

AGS, MKN28, MKN45, KATO III, SNU1, SNU5, SNU216, SNU484, SNU638, SNU668, SNU719, YCC2 등의 위암세포주들을 실험에 사용하였으며 10%의 소혈청 (Eiptech-Bio, TX)과, 100 units/ml의 페니실린 G와 100µg/ml (Invitrogen Corp.)의 스트렙토마이신을 섞은 RPMI 1640 (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA)에 유지하였다.

2. RNA 추출과 RT-PCR 분석

RNA 추출과 cDNA의 합성은 이전에 기술된 방법을 이용하였다.²⁷ 위암세포주에서 mRNA의 발현을 알아보기 위해 CC 키모카인 수용체들에 대한 RT-PCR 분석을 시도하였으며 CCR4의 경우 primer 순서는 sense의 경우 5'-CCCTCGATAAAGCATATAC-3'이고 antisense의 경우 5'-GTGAACAAAAGCCAGAGTTT-3'이었다. PCR의 결과물은 2% agarose 젤 위에서 크기를 나누었고 ethidium bromide 염색하에 가시화하였다.

3. Western blot 분석

세포들을 lysis 용액(Cell Signaling)을 이용하여 녹인 후 sodium fluoride (10µmol/L, Fisher Scientific, Hampton, NH)와 phenylmethylsulfonyl fluoride (100µg/mL, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)를 첨가하여 녹였다. 녹인 세포들은 12% SDS-polyacrylamide 젤에 나눈 뒤 분리된 단백질을 nitrocellulose에 옮겼다. 이 후 2차 항체와 반응시킨 뒤 CCR4 항체(Ab 1669, Abcam, London, UK)와 probing 한 뒤 SuperSignal chemiluminescence substrate (Pierce, Rockford, IL)에 배양하였다. 이 후 Kodak X-Omat Blue XB-1 필름에 노출시켰다.

4. Flow cytometry 분석

flow cytometry 분석은 Pharmingen사에서 추천한 프로토콜대로 하였다. 우선 1% FCS-PBS 용액에서 1시간 10^5 세포를 배양한 뒤 CCR4 mouse mAb (2H4, Pharmingen, sandiego, CA)로 표시한 뒤 세척하고 FITC-conjugated goat antimouse IgM (Pharmingen)에 배양하고 세척을 반복하였다. 각 샘플에서 FACS scan을 이용 만개의 세포를 모아 CellQuest software (Beckton Dickson, San Jose, CA)를 이용하여 분석하였다.

5. Confocal microscopy

MKN28 세포 5×10^4 /ml를 각 well에 200 μ l씩 분주한 뒤 over night incubation 후 serum starvation 후 다시 24시간 동안 incubation하고 CCL17을 각 well 당 1ng씩 처리하고 0분, 10분, 30분, 60분 간격으로 incubation하여 PBS로 세척하고 0.5% triton 처리한 뒤 PBS로 다시 3회 세척한다. 5% BSA 처리 후 PBST 3회 세척하고 일차항체 처리 후 세척하고 2차 항체 처리 후 다시 3회 세척한 뒤 mounting 후 사진을 찍었다.

6. Immunohistochemistry

파라핀 블록을 4 μ m 두께로 절편한 뒤 56C에서 16시간 말린 후 자일렌으로 왁스를 녹이고 에탄올을 이용하여 함수시켜 인산 버퍼를 이용 세척하였다. 항원의 발현은 오토클레이브에서의 가열을 이용하였고 자가 peroxidase는 염색 전에 차단하였다. 염색은 streptavidin-peroxidase 방법을 이용하였고 2개의 블록을 이용하였다. 1차 항체는 CCR4(NLS351, rabbit polyclonal, Novus): antigen retrieval CC1(Ventana)을 이용하였고 1:100으로 희석하여 사용하였다.

7. Proliferation assay

세포의 증식은 BrdU cell proliferation ELISA (Rosche, Mannheim, Germany)를 이용하였고 각 well당 2000개의 세포를 깔고 10%, 1%, 0%의 FCS에서 24시간동안 유지한 뒤 PBS나 100ng/mL의 CCL17으로 24시간 동안 자극하였다. BrdU를 2시간 동안 첨가한 뒤 생산자의 지시대로 세포를 처리하였다. BrdU는 379nm에서 colorimetric assay를 하였다.

8. Migration assay and migration inhibition assay

migration assay는 24-well cell culture chamber를 이용하였다. chemotaxis buffer에 10만개의 세포를 깔고 CCL17이 있는 것과 없는 buffer를 포함한 well에 옮겼다. 이 후 24시간 동안 배양한 뒤 막의 하단으로 이동한 세포들을 200배의 광학현미경 하에서 5개의 다른 부위에서 염색한 뒤 숫자를 세었다. migration의 억제제는 항체로 전처리한 후 세포를 세는 방식으로 하였다.

9. Tissue microarray

가. 대상 환자

대상 환자는 본원에서 2001년 3월부터 2002년 6월까지 위선암으로 근치적 절제술을 받은 환자를 대상으로 조직보관상태가 비교적 양호한 353명을 대상으로 하였다.

나. Tissue microarray

353명의 파라핀 종양조직을 검토하여 2mm 지름 크기로 조직을 채취한 후 배열한 뒤 trephine apparatus를 이용하여 새로운 파라핀 블록을 제작하였다. 이 후 각각의 블록에서 2곳의 각기 다른 부위에서 샘플을 만들었으며 종양이 10%이상인 경우 적절한 경우로 정의하였으며 모든 경우 적절한 조직이 얻어졌다. 이 후의 염색과정은 면역화학

염색 과정으로 5번과 동일하게 진행하였다.

다. 통계분석

모든 통계분석은 'Statistical Package for Social Science' version 9.0 for Windows (SPSS, Inc., Chicago, IL)을 이용하였고 각 군 간의 비교는 Student's t test와 two-tailed chi-square test를 이용하였다. 재발의 위험인자를 찾는 데는 로지스틱 회귀분석을 이용하였다.

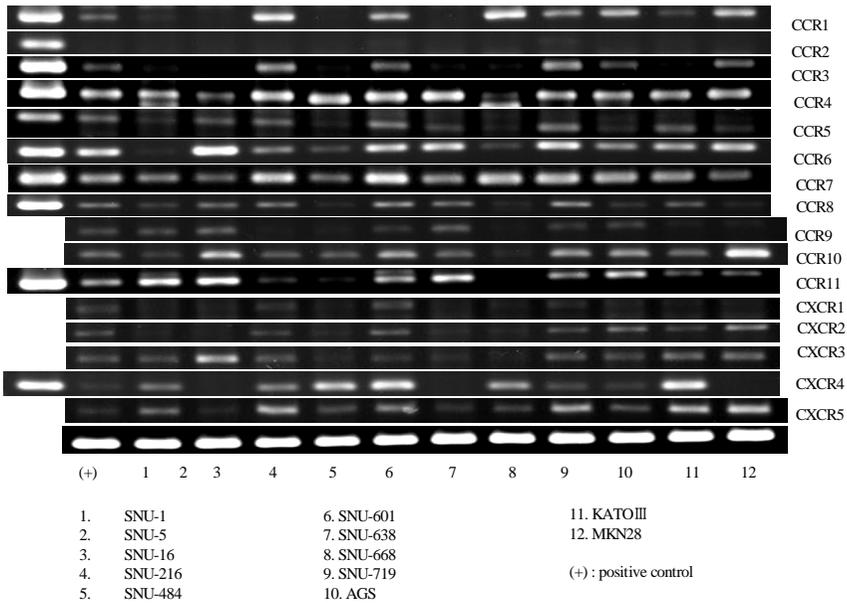
환자의 추적관찰은 2006년 12월 31일을 기준으로 하였고 마지막 추적 당시 22명(6.2%)의 환자의 생사를 알 수 없었다. 추적관찰 기간의 중위값은 58개월(3~68개월)이었으며 환자의 생존곡선은 Kaplan-Meier 방법으로 계산하였으며 log-rank test로 비교하였다. p값은 0.05미만인 경우 의의 있는 것으로 하였다.

III. 결과

1. Expression of chemokine receptors in cultured gastric cell lines

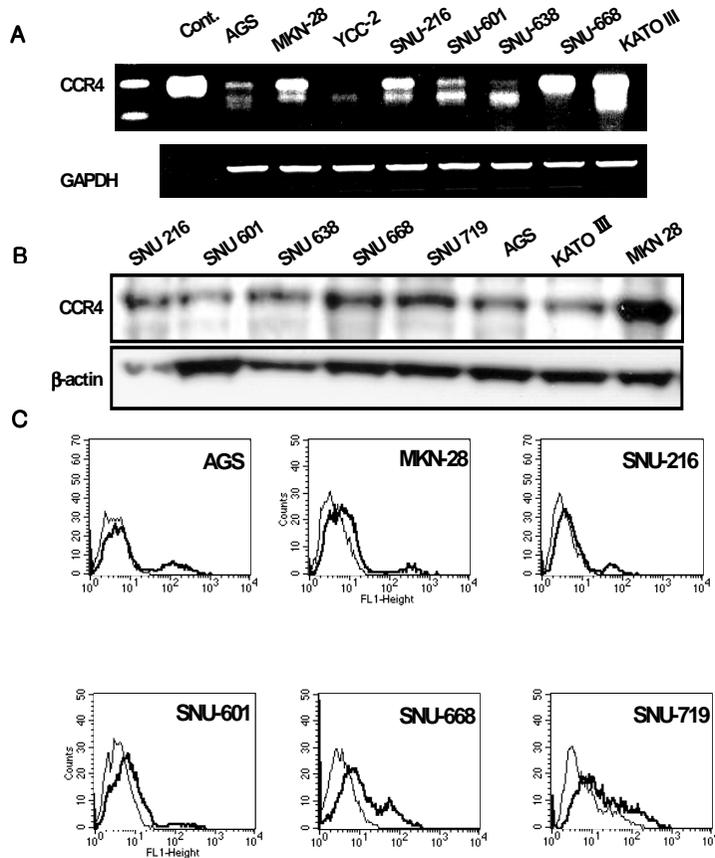
RT-PCR 결과 다양한 키모카인 수용체 가운데 CCR4, CCR7, CXCR4 등 CXCR과 CCR 계열의 키모카인 수용체가 비교적 흔하게 발현되었다(Figure 1). 이 중 CCR7은 위암의 림프절 전이와 관련이 있다는 사실이 보고되어 있고 CXCR4의 경우 위암의 복막전이와 관련이 있음이 보고되어 있다. 또한 최근 CCR6의 경우 대장암에서 간 전이와 연관이 있다는 보고가 있었으나 CCR4의 경우 위암이나 다른 고형암에서의 역할에 대한 보고가 없어 이후의 연구는 CCR4를 대상으로 진행하였다.

Figure 2. mRNA expression of chemokine receptors in stomach cancer cell line



8개의 대표적인 위암세포주를 이용하여 반복하여 RT-PCR을 이용하여 CCR4의 발현여부를 확인한 결과 8개의 세포주 가운데 YCC-2를 제외한 나머지 7개의 세포주에서 발현되었다. AGS와 SNU-638 세포주의 경우 상대적으로 약하게 발현되었다(Figure 2a).

Western blot과 FACS 결과 RT-PCR 결과와 마찬가지로 MKN-28, SNU-216, SNU-668, KATO III 세포주에서 강하게 발현되었다 (Figure 3b, c). 이 중 MKN-28 세포주에서 가장 발현이 많이 되었고 SNU-668과 719에서 그 다음으로 발현이 많이 되었다.



(Figure 3a, b, c) A, Semiquantitative reverse transcription -polymerase analysis of CCR4 mRNA expression in 8 gastric cancer cell lines. B, Western blotanalysis of CCR4 protein expression in 8 gastric cancer cell lines. C, Flow cytometry analysis of cell surface expression of CCR4 in gastric cancer cell lines.

2. Expression of CCR4 in primary gastric cancer tissue

면역화학염색 결과 CCR4는 암세포와 림프구를 비롯한 염증세포들에서 발현되는 것을 관찰할 수 있었다. 반면 정상 위점막세포에서는 관찰이 되지 않았으나 일부의 평활근세포와 신경세포에서는 관찰이 되었다. 염색되는 양상은 기존의 보고들에서처럼 세포질에 염색이 되었다 (Figure 4a).

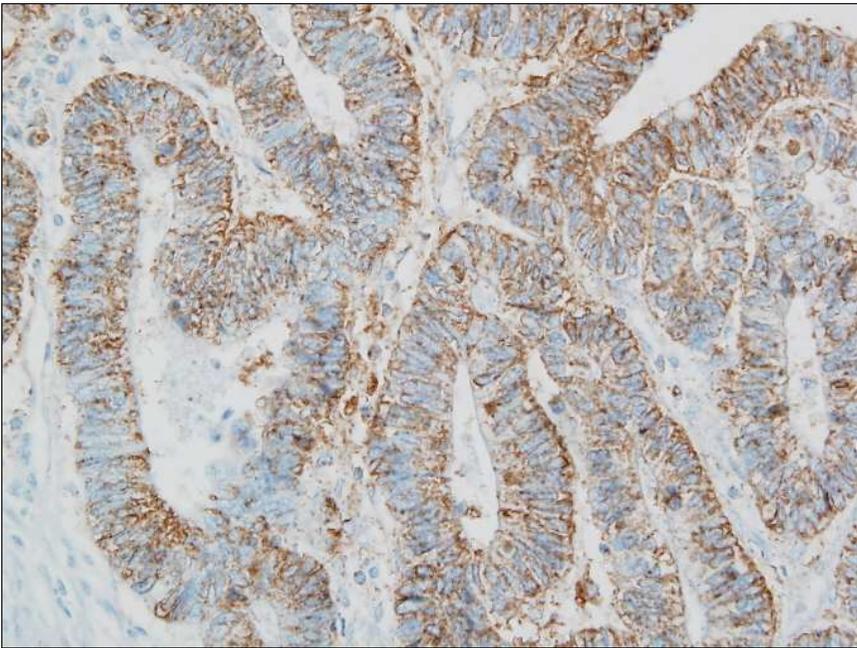


Figure 4a. Histochemistry of primary tumor lesions. Cytoplasm of the gastric cancer cells were stained using anti-CCR4 antibody.

MKN-28 세포주를 이용하여 CCR4의 Ligand인 CCL17을 처리한 후 시간별로 confocal microscopy를 이용해 관찰한 결과 30분 경과한 뒤 actin의 재배열이 일어나며 원형의 세포가 방추형으로 변화하여 세포의 형태학적인 변화가 뚜렷하게 이루어짐을 관찰할 수 있었다 (Figure 4b).

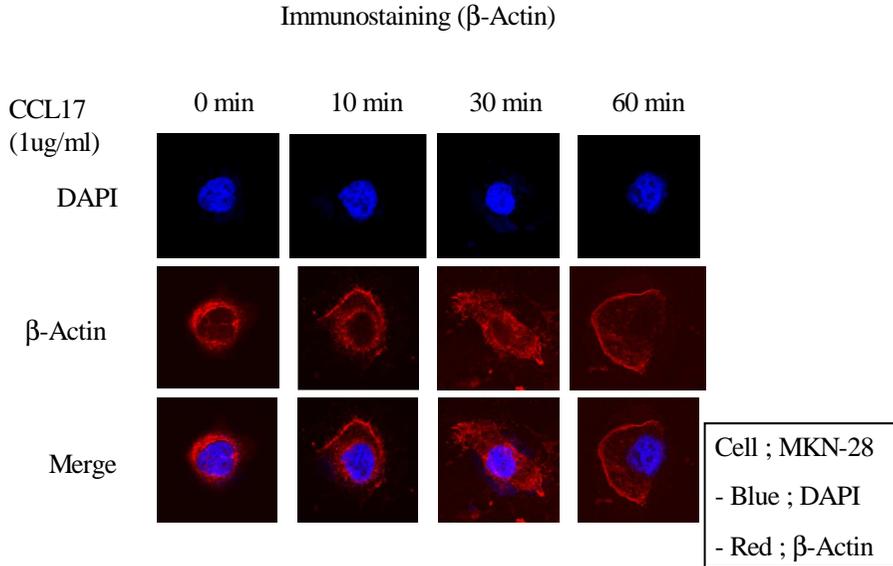
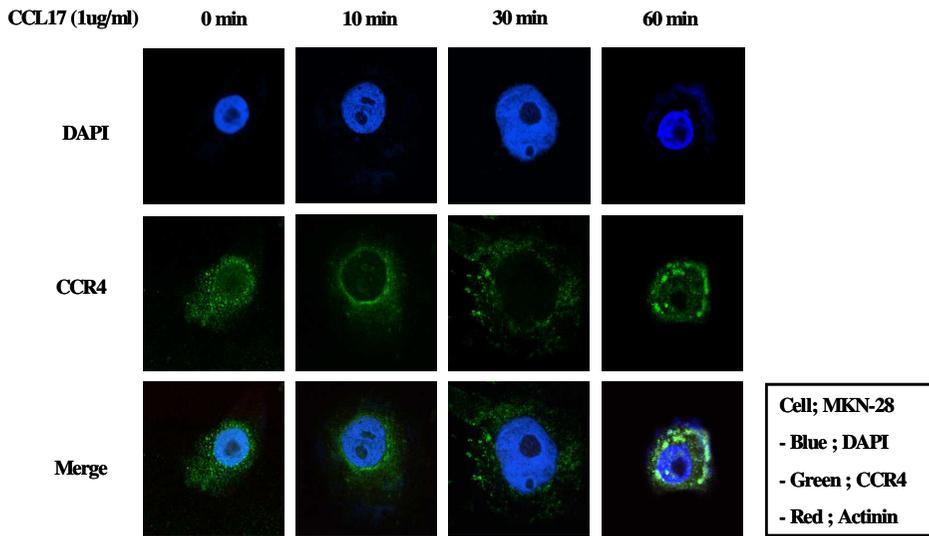


Figure 4b. Confocal microscopy of gastric cancer cell after incubation with CCL17, ligand of CCR4. Morphological changes and rearrangement of actin were observed after 30minutes.

반면 CCL17을 처리한 후 시간별로 confocal microscopy로 CCR4를 염색하여 관찰한 결과 면역화학염색 결과와 마찬가지로 시간경과와 관계없이 주로 핵을 제외한 주로 세포막과 일부의 세포질 주위로 염색이 되는 것을 관찰할 수 있었다 (Figure 4c).

Figure 4b. Confocal microscopy of gastric cancer cell after incubation with CCL17, ligand of CCR4. Cellular membrane was observed as green color reacting CCR4.



3. Expression of CCR4 has no effect on gastric cancer cell proliferation

CCR4 수용체의 활성화가 암세포의 증식을 유도하는지에 대해 상반된 결과들이 보고되고 있다. 이에 저자 등은 CCL17이 수용체와 결합하여 위암세포의 증식을 유도하는지 알아보기 위해 BrdU assay를 하였다. 일반적인 조건 하에서 MKN-28, SNU-601의 증식이 일어나는지 알아본 결과 혈청에 의해서는 세포증식이 다소 일어났으나 CCL17의 첨가와는 상관없이 증식이 일어나지 않았다(Figure 5).

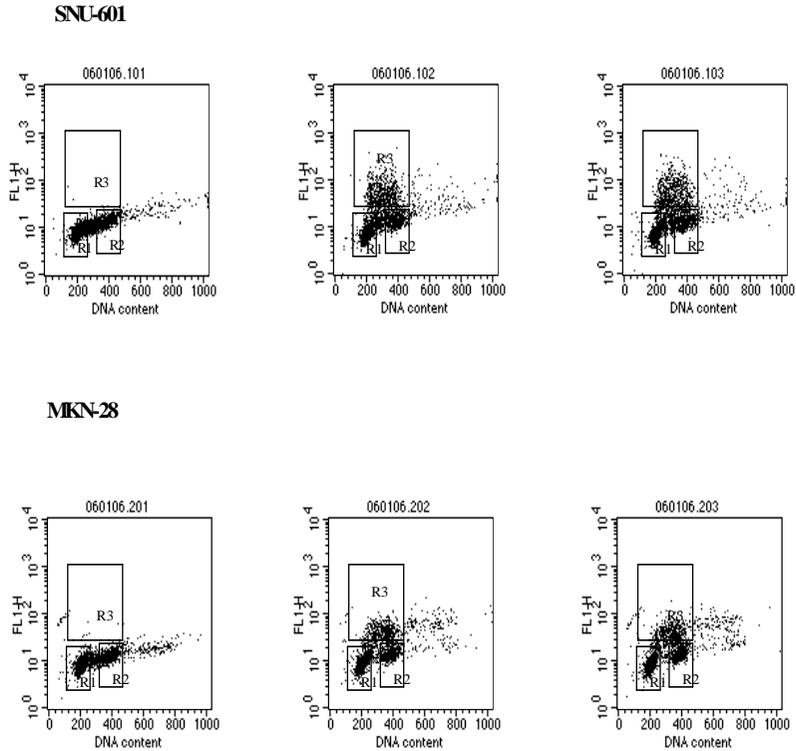


Figure 5. Proliferation assay of CCR4-positive gastric cancer cells.

4. Migration and its inhibition of gastric cancer cell by CCR4 and its antibody

SNU-216, 601, 668, MKN-28 세포주를 이용하여 transwell migration assay를 한 결과 CCL17에 의해 뚜렷한 세포의 이동을 관찰할 수 있었다. 하지만 AGS의 경우에는 이러한 효과를 관찰할 수 없었다 (Figure 6a). 특히 이러한 세포의 이동은 양-반응관계를 보였다 (Figure 6b). 또한 이러한 세포의 이동은 항체를 처리했을 때 세포주에 따라 반응정도는 다소 차이가 있었으나 억제되었으며 이러한 억제 효과 역시 양-반응관계를 보였다(Figure 6c).

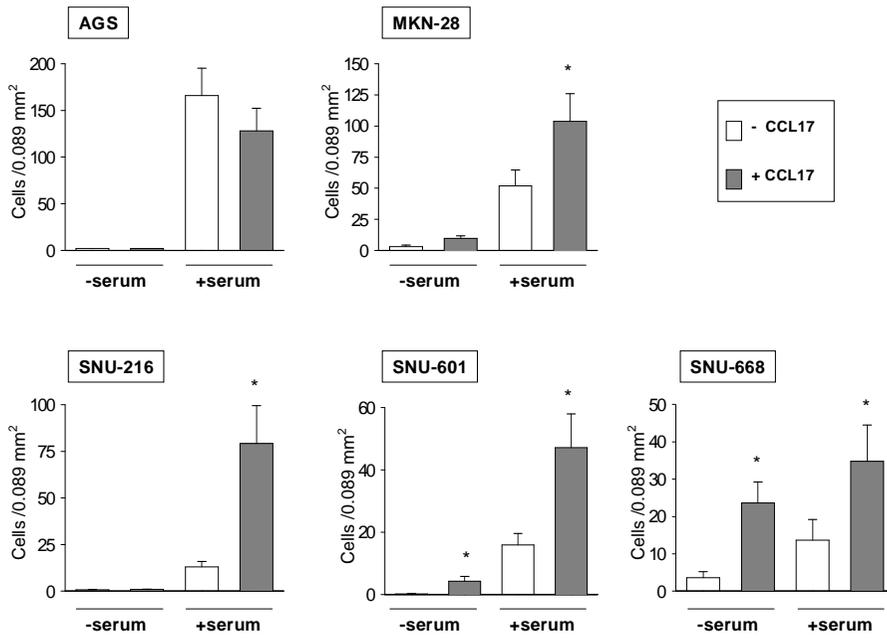


Figure 6a. Migration assay of CCR4-positive gastric cancer cells.

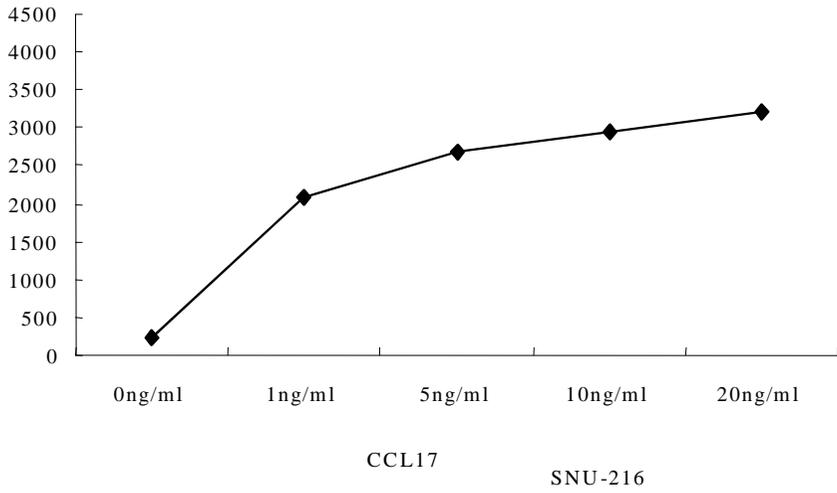


Figure 6b. Migration of SNU216 cells responding to CCL17. It showed dose-dependent relationships.

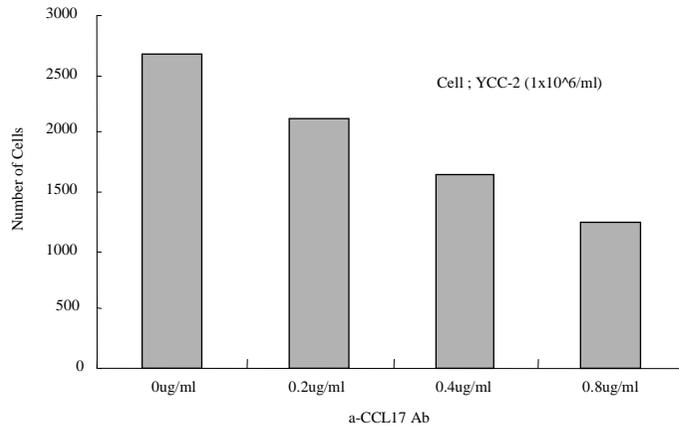


Figure 6c. Inhibition of migration using anti-CCL17 antibody. It showed dose-dependent manner of inhibition of migration.

5. Tissue microarray of CCR4

가. 대상 환자

대상 환자는 남자가 230명(65.2%), 여자가 123명(34.8%)였으며 환자의 평균 연령은 55.9세였다. 환자들의 임상병리학적 양상은 표 2와 같다.

Table 2. 대상 환자의 임상병리학적 특성

임상병리학적 인자	수	%
연령(세)	55.9±11.9	
성		
남성	230	65.2
여성	123	34.8
육안소견		
조기위암	173	49.0

I형	1	0.3
II형	38	10.8
III형	117	33.1
IV형	24	6.8
암종의 위치		
상부 1/3	53	15.0
중부 1/3	66	18.7
하부 1/3	234	66.3
암종의 크기(cm) 5.4±3.5		
조직학적 소견		
고분화	116	32.9
저분화	237	67.1
침윤도		
T1	173	49.0
T2	90	25.5
T3	86	24.4
T4	4	1.1
림프절 전이		
N0	190	54.4
N1	82	23.2
N2	53	15.0
N3	26	7.4
병기		
I	201	56.9
II	45	12.7
III	74	21.0
IV	33	7.4
재발		
예	276	78.2
아니오	77	21.8
재발양상		

국소	12	16.0
혈행성	21	28.0
복막	29	38.7
기타	13	17.3

나. Tissue microarray

CCR4에 양성을 보인 경우는 175예로 전체의 49.5%였다(Figure 7). 모든 환자를 대상으로 비교한 결과 CCR4 양성에 따른 재발율의 차이는 없었다 (Table 3).

Table 3. 모든 위암환자에서 CCR4 양성에 따른 재발의 차이

CCR4	재발		P값
	재발 양함(%)	재발함(%)	
음성	97(41.3)	26(41.3)	0.999
양성	138(58.7)	37(58.7)	

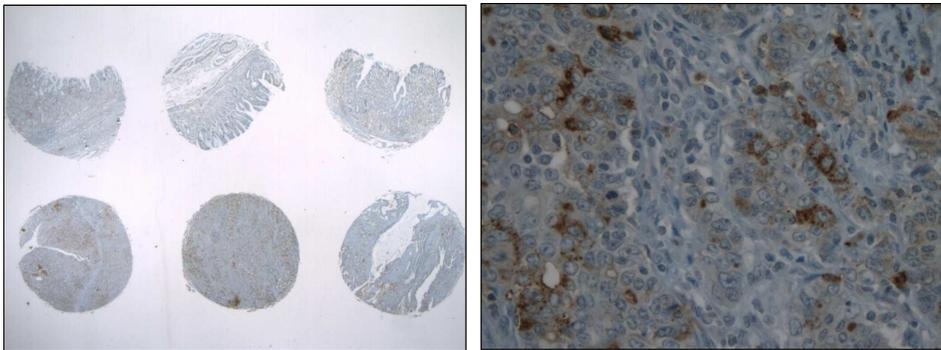


Figure 7. Tissue microarray for CCR4 in gastric cancer tissues

반면 진행성 위암환자를 대상으로 분석한 결과 CCR4 양성에 따른 재발율의 차이를 관찰 할 수 있었다(표 4).

Table 4. 진행성 위암환자에서 CCR4 양성율에 따른 재발의 차이

CCR4	재발		P값
	재발 양함(%)	재발함(%)	
음성	55(58.5)	24(42.9)	0.046
양성	39(41.5)	32(57.1)	

진행성 위암의 경우 분화도가 좋을수록 양성율이 높았으며 그 외의 나이나 상별 등의 임상병리학적 인자들 가운데에서는 아무런 상관관계를 보이지 않았다.

진행성 위암환자들의 경우 재발에 대한 로지스틱 회귀분석의 결과 림프절 전이 정도와 CCR4 양성유무가 유의한 위험인자로 분석되었다 (Table 5).

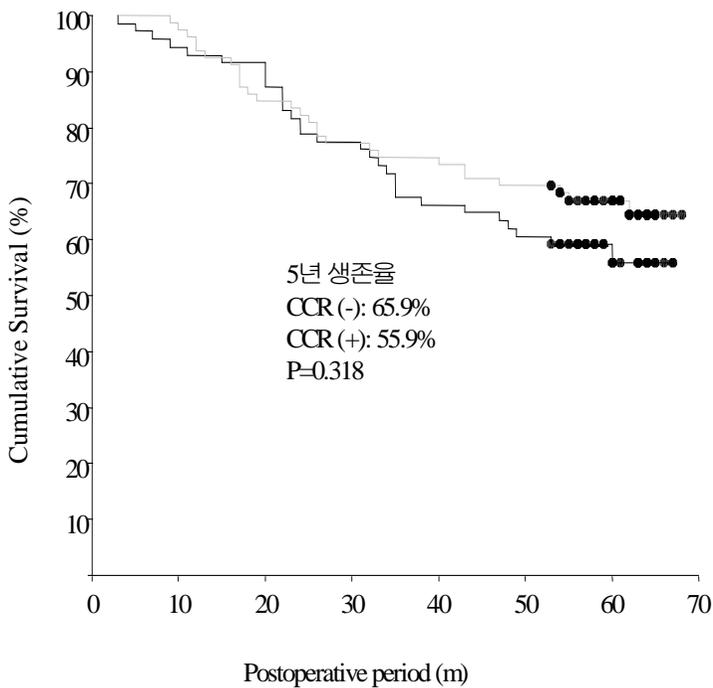
Table 5. 진행성 위암환자에서 재발의 위험인자에 대한 로지스틱 회귀분석 결과

인자	Coefficient	S.E.	O.R.	95% C.I.	P 값
성별					
남					
여	0.184	0.419	1.202	0.489-2.245	0.661
연령	0.012	0.017	1.012	0.985-1.047	0.490
암종의 위치					0.289
상부 1/3					
중부 1/3	0.779	0.699	2.179	0.463-6.697	
하부 1/3	0.723	0.608	2.060	0.616-6.354	
분화도					0.448
저분화					
고분화	0.388	0.510	1.473	0.570-4.182	
침윤도					0.052
T2					
T3	-2.197	2.812	0.999	0	
T4	-2.093	2.812	0.999	0	

림프절 전이					0.024
N0					
N1	-1.316	0.733	0.268	0.055-0.943	
N2	-1.412	0.654	0.244	0.062-0.783	
N3	-0.227	0.650	0.797	0.173-2.168	
CCR4					0.049
음성					
양성	0.799	0.405	2.223	0.669-4.767	

CCR4 양성 유무에 따른 생존곡선을 계산해 본 결과 통계적으로 유의한 차이는 없었다(P=0.317, Figure 8).

Figure 8. CCR4 양성에 따른 생존곡선



IV. 고찰

키모카인은 싸이토카인 중에서도 가장 연구가 많이 이루어지고 있는 분야의 하나로 일련의 연구결과들에서 암세포의 특정부위의 이동에 관여하여 기관 특이적 전이에 관여한다고 보고되고 있다.^{16,17,26} 본 연구에서는 위암세포에서 기존에 보고되어 있는 CXCR4나 CCR7 이외에 CCR 키모카인 수용체의 일종인 CCR4가 빈번히 발현되고 그 리간드인 CCL17이 위암세포의 이동에 관여하며 이상적으로는 위암의 전이와 관련이 있으며 위암세포의 이동이 항체에 의해서 억제 된다는 사실을 발견하였다.

암환자들이 사망하게 되는 원인은 궁극적으로 암의 전이에 의한 것으로 일부에서 암세포의 전이와 관련이 있는 물질들이 밝혀지기는 했으나 아직도 그 기전은 잘 알려져 있지 않다. 아직까지 작용기전이 잘 알려져 있지 않은 KISS 1 등의 유전자들이 암의 전이와 관련이 있다고 알려져 있으며 세포들 간의 결합능력이나 단백질 분해효소의 활성화가 암세포의 침투와 이동에 관련 있다는 것은 잘 알려져 있다.^{28,29} 위암에서 이러한 내부 인자들의 예들이 matrix metalloproteinase, p27, vascular endothelial growth factor 등과 같은 것들이다.³⁰⁻³⁴ 외부의 자극도 암세포의 전이에 중요할 것으로 생각되지만 암세포의 방향성을 결정하는 인자들 또한 중요한 역할을 할 것으로 생각된다.

최근의 연구들에서 보면 기관특이적인 전이는 전이되는 기관에서의 키모카인과 암세포에 존재하는 그 수용체의 역할이 중요하다고 보고되고 있다.^{16,26} 예를 들면 VHL 암억제유전자는 키모카인 수용체를 조절하고 CXCR4는 유방이나 난소암 세포에 많이 존재하여 이 수용체의 리간드인 CXCL12/SDF-1이 이들 암종이 잘 전이되는 폐나 뼈에 많이 존재하며 원발암과 전이된 암에서 CXCR4의 존재가 확인되었고 동물실험에서 항체에 의해 전이가 억제가 된다는 것이다.³⁵

위암의 경우 CCR7이 림프절 전이와 관계있으며 CXCR4의 경우 위암의 복막전이와 관련이 있다고 보고된 바 있다.²⁶ 하지만 아직 보고된 바가 많지 않다.

CCR4의 경우 백혈병과 같은 혈액성암에서의 보고는 있었으나 고형암에서 보고된 바는 없다. 기존에 전이와 관련이 있다고 보고된 키모카인 수용체들은 CXCR4가 가장 많았고 이 외에 CCR7과 CCR6가 있었으며 CXCR3 등이 극히 일부에서 보고된 바 있다.²⁴ CXCR4가 가장 많이 보고되었던 것은 HIV의 병리와 관련되어 많은 연구가 되어 왔고 혈행성 전이와 관련이 있으며 키모카인 수용체의 경우 같은 키모카인이 여러개의 수용체와 결합하기(redundancy) 때문인 것으로 생각된다.³⁶ 키모카인을 ELR motif의 존재유무에 따라 혈관생성을 하는 키모카인과 그렇지 않은 키모카인으로 분류하기도 하는데 전이와 관련이 있는 것으로 알려진 키모카인들은 ELR motif를 갖고 있는 키모카인들이다. 신생혈관생성 자체가 전이의 한 부분이므로 키모카인의 기관특이적 전이와 신생혈관 생성이 관련이 있는 것으로 보인다.

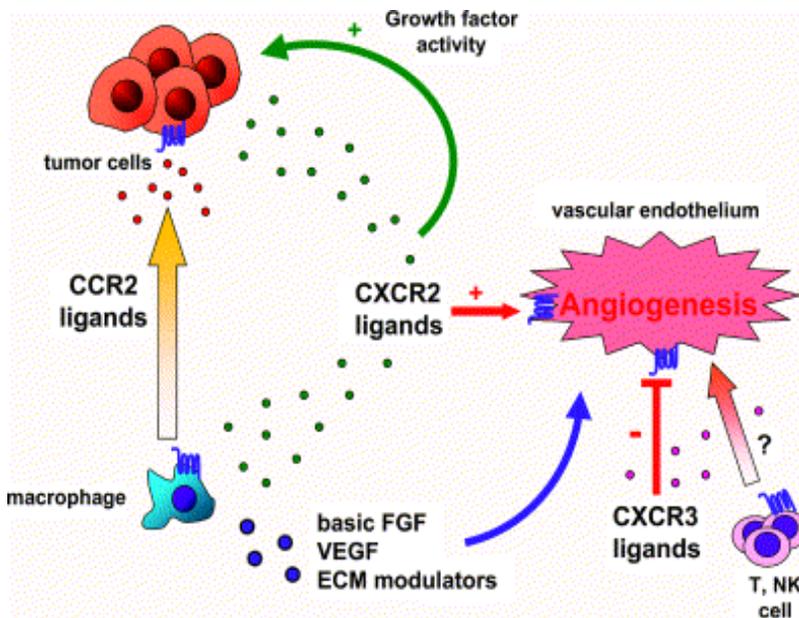


Figure 9. Mechanism of angiogenesis via chemokine receptor

복막을 이루는 중배엽성 세포들이 분비하는 키모카인 중에 CCR4를 수용체로 삼는 것들이 많아 CCR4가 위암의 복막전이와 관련 있을 가능성이 있을 것으로 생각되었으나 본 연구에서 복막전이는 뚜렷한 상관관계를 찾지 못하였다. 이는 CCR4의 리간드인 CCL17이 복막에

특이적으로 존재하기 보다는 신체 각 부위에 골고루 존재하기 때문인 것으로 생각된다.

CCR4의 면역염색화학 양상은 기존의 발표들과 다소간의 차이를 보였다.³⁷⁻⁴⁰ 세포질에 주로 염색이 된다는 점에서는 마찬가지였으나 근육세포나 신경세포도 일부 염색이 되었다. 이러한 현상이 단순한 배경염색인지는 좀 더 연구가 필요할 것으로 생각된다. 하지만 confocal microscopy를 이용한 염색의 경우 예상대로 주로 CCR4가 세포막에 염색이 되어 세포막과 결합된 수용체임을 확인할 수 있었다.

키모카인이 수용체와 결합하면 칼슘의 세포 내로의 이동이 이루어지는 것으로 알려져 있으며 actin의 재배열이 생기는 것으로 알려져 있다.⁴¹ 칼슘의 이동은 확인하지 않았으나 리간드에 의해 세포가 이동하며 이러한 현상이 리간드의 양이 많으면 많을 수록 이동하는 정도도 증가한다는 점과 actin의 리간드에 의한 재배열이 관찰된 점, 그리고 수용체를 항체를 이용하여 차단함으로써 세포의 이동이 억제되는 점 등으로 미루어 위암세포에 존재하는 CCR4는 기능을 하는 것으로 생각된다.⁴²

일반적으로 키모카인은 세포의 증식에 관여하기도 하는데 본 연구에서는 리간드의 양에 상관없이 세포의 증식이 일어나지 않아 CCR4가 위암세포의 이동에는 관여하나 증식에는 영향이 없는 것으로 생각된다.

파라핀 블록을 이용한 면역화학염색에서도 염색되는 양상은 세포질에 주로 염색되는 양상이었으며 단변량 분석 결과 CCR4는 기존의 임상병리학적 인자들과는 무관하게 재발율의 차이를 보였다. 특히 키모카인이 세포의 분화 등과도 연관이 있는 것으로 알려져 있으나 세포의 조직학적 양상 등 과도 상관관계를 보이지 않았다. 이는 대상 예가 350명 이상이었던 점을 고려할 때 대상 예가 적기 때문에 관련이 없는 것으로 보이는 현상은 아닌 것으로 생각된다.

다변량 분석결과에서도 CCR4 양성이 암의 침윤도나 림프절 전이와 더불어 재발에 유의한 위험인자임을 알 수 있어 CCR4가 임상적으로도 이용 가능한 재발의 표지자로 생각된다. 추 후 더 많은 대상예로 연구를 한다면 각 병기별로 분석이 가능하여 같은 병기 내에서 재발

의 고위험군을 찾아냄으로써 예후인자로써 뿐 아니라 예를 들어 항암 화학요법 등의 부가적인 치료 대상을 선정하는데도 도움이 될 수 있을 것으로 생각된다.

CCL17은 CCR4와 CCR8과 모두 결합할 수 있으나 CCR8의 경우 위암에서 발현되는 경우가 드물어 CCL17에 유도되는 암세포의 증식과는 무관하게 나타나는 이동능력의 향상은 CCR4에 의한 것으로 생각된다.¹⁷ 또한 이러한 운동능력은 항체에 의해 억제될 것을 관찰하였다. 추 후 동물실험을 통해서 이러한 억제현상이 생체 내에서도 이루어지는지 확인할 필요가 있을 것으로 생각된다. 키모카인 연구가 비교적 많이 이루어진 유방암의 경우 동물실험에서 indol-3-carbinol과 같은 천연적인 CXCR4 억제제를 이용하여 전이를 억제할 수 있다는 보고가 있으며 이들의 기전 또한 보고되어 있다.⁴³ 향후에는 이와 유사한 키모카인 수용체 억제제가 개발되어 유사한 보고가 나올 것으로 기대된다.

CCR4에 양성을 보이는 경우 임상적으로 전이가 빈번하게 일어날 뿐 아니라 비록 통계적인 차이는 없었으나 생존곡선의 경우, 약 30개월 이후에 CCR4 양성 유무에 따라 생존곡선의 기울기가 차이가 나는 것으로 보아 위암의 전이에 있어 CCR4가 적어도 일부에서 관여한다는 사실은 분명해 보인다. 일반적으로 위암환자의 경우 근치적 수술 후 2년 이내에 재발하는 환자의 70%가 재발을 하게 되고 이들이 대개 1년 이내에 사망하므로 생존곡선이 30개월 이후부터는 CCR4 양성 유무에 따라 차이가 나는 것으로 보아 어떠한 형태로든 재발과 관계가 있는 것으로 보이며 대상예가 늘고 추적관찰기간이 길어지면 통계적인 차이를 볼 수 있을 것으로 기대된다. 최근 장흑색종의 경우 micrometastasis된 병변에서 CCR9이 관찰된 것으로 보고된 바 있다. 이는 기존에 전이병소에서 키모카인 수용체가 보고된 것보다 더욱 전이와의 관련성을 시사하는 연구 결과로 생각된다.

V. 결론

본 연구에서는 기존에 기관특이적 전이와 관련이 있는 것으로 알려진 CXCR과 CCR 키모카인 수용체가 위암에서 얼마나 발현되는지와 실제로 전이와 연관성이 있는지 알아보고자 하였다. 우선 다양한 위암세포주에서 RT-PCR을 이용하여 CXCR과 CCR 키모카인 수용체들을 조사하였고 이를 통해 CCR4가 가장 빈번하게 발현된다는 사실을 발견하였다. 이후 CCR4가 실제로 기능을 하는지 migration assay, migration inhibition assay, confocal microscopy 등을 이용하여 확인하였고 파라핀 조직에서 염역화학염색을 통해 CCR4의 발현이 전이와 관련이 있는지 조사하였다.

실험결과 기존에 보고가 없던 CCR4가 위암세포에서 빈번하게 발현이 된다는 사실을 알았으며 CCR4의 리간드인 CCL17에 의해 actin의 재배열이 이루어지고 세포의 이동이 이루어지며 이러한 세포의 이동이 항체에 의해 억제되는 점으로 보아 위암세포에 존재하는 CCR4가 기능을 하며 임상적으로 CCR4의 발현이 전이와 관련이 있다는 사실을 알게 되었다.

이상의 연구결과 본 연구를 통해 위암에서 CCR4가 빈번히 발현된다는 사실을 최초로 알게 되었으며 이들이 기능을 하며 전이와 관련이 있다는 사실을 통해 CCR4를 억제함으로써 위암의 전이를 줄이는데 일정한 역할을 할 가능성을 제시하였다.⁴⁴⁻⁴⁸

참고문헌

1. Shin HR, Ahn YO, Bae JM, Shin MH, Lee DH, Lee CW, et al. Cancer incidence in Korea. *Cancer Research and Treatment* 2002 34: 405-8.
2. Kim JP. Surgical results in gastric cancer. *Semin Surg Oncol* 1999; 17:132-8.
3. Siewert JR, Bottcher K, Stein HJ, Roder JD, and German Gastric Carcinoma Study Group. Relevant prognostic factors in gastric cancer: ten-year results of the German Gastric Cancer Study. *Ann. Surg* 1998 228: 449-61.
4. Macdonald JS, Smalley SR, Benedetti J, Hundahl SA, Estes NC, Stemmermann GN, et al. Chemoradiotherapy after surgery compared with surgery alone for adenocarcinoma of the stomach or gastroesophageal junction. *N. Engl. J. Med* 2001 345: 725-30.
5. Yoo CH, Noh SH, Shin DW, Choi SH, Min JS. Recurrence following curative resection for gastric carcinoma. *Br. J. Surg* 2000 87: 236-42.
6. Marrelli D, Roviello F, De Stefano A, Fotia G, Giliberto C, Garosi L, et al. Risk factors for liver metastases after curative surgical procedures for gastric cancer: a prospective study of 208 patients treated with surgical resection. *J. Am. Coll. Surg* 2004 198: 51-8.
7. Kodera Y, Ito S, Yamamura Y, Mochizuki Y, Fujiwara M, Hibi K, et al. Follow-up surveillance for recurrence after curative gastric cancer surgery lacks survival benefit. *Ann. Surg. Oncol* 2003 10: 898-902.
8. Nicolson GL, Brunson KW, Fidler IJ. Specificity of arrest, survival, and growth of selected metastatic variant cell lines. *Cancer Res.* 1978 38:4105-11.
9. Pantel K, Brakenhoff RH. Dissecting the metastatic

- cascade. *Nat Rev Cancer*. 2004 4: 448-56
- Yeatman TJ, Nicolson GL. Molecular basis of tumor progression: mechanisms of organ-specific tumor metastasis. *Semin Surg Oncol*. 1993 9: 256-63.
10. Yoo CH, Noh SH, Shin DW, Choi SH, Min JS. Recurrence following curative resection for gastric carcinoma. *Br J Surg* 2000 87:236-242.
 11. Jawhari A, Jordan S, Poole S, Browne P, Pignatelli M, Farthing MJ. Abnormal immunoreactivity of the E-cadherin-catenin complex in gastric carcinoma: relationship with patient survival. *Gastroenterology* 1997 112: 46-54.
 12. Yonemura Y, Fujimura T, Ninomiya I, Kim BS, Bandou E, Sawa T, et al. Prediction of peritoneal micrometastasis by peritoneal lavaged cytology and reverse transcriptase-polymerase chain reaction for matrix metalloproteinase-7 mRNA. *Clin. Cancer Res* 2001 7: 1647-53.
 13. Muller W, Schneiders A, Hommel G, Gabbert HE. Expression of nm23 in gastric carcinoma: association with tumor progression and poor prognosis. *Cancer* 1998 83: 2481-7.
 14. Palmieri D, Bronder JL, Herring JM, Yoneda T, Weil RJ, Stark AM, Kurek R, Vega-Valle E, Feigenbaum L, Halverson D, Vortmeyer AO, Steinberg SM, Aldape K, Steeg PS. Her-2 overexpression increases the metastatic outgrowth of breast cancer cells in the brain. *Cancer Res*. 2007; 67: 4190-8.
 15. Hult J, Suyama K, Chung S, Keren R, Agiostratidou G, Shan W, Dong X, Williams TM, Lisanti MP, Knudsen K, Hazan RB. N-cadherin signaling potentiates mammary tumor metastasis via enhanced extracellular signal-regulated kinase activation. *Cancer Res*. 2007; 67: 3106-16
 16. Muller A, Homey B, Soto H, Ge N, Catron D, Buchanan ME, et al. Involvement of chemokine receptors in breast cancer

- metastasis. *Nature* 2001; 410: 50-6.
17. Zlotnik A, Yoshie O. Chemokines: a new classification system and their role in immunity. *Immunity*, 2000; 12: 121-7.
 18. Rossi D, Zlotnik A. The biology of chemokines and their receptors. *Annu Rev Immunol.* 2000;18:217-42.
 19. Baggiolini M, Dewald B, Moser B. Human chemokines: an update. *Annu Rev Immunol.* 1997;15:675-705.
 20. Foster SJ, Aked DM, Schroder JM, Christophers E. Acute inflammatory effects of a monocyte-derived neutrophil-activating peptide in rabbit skin. *Immunology.* 1989;67:181-3.
 21. Constantin G, Majeed M, Giagulli C, Piccio L, Kim JY, Butcher EC, et al. Chemokines trigger immediate beta2 integrin affinity and mobility changes: differential regulation and roles in lymphocyte arrest under flow. *Immunity.* 2000;13:759-69.
 21. Mitchison TJ, Cramer LP. Actin-based cell motility and cell locomotion. *Cell.* 1996; 84: 371-9.
 22. Crown SE, Yu Y, Sweeney MD, Leary JA, Handel TM. Heterodimerization of CCR2 chemokines and regulation by glycosaminoglycanbinding. *J Biol Chem.* 2006; 281: 25438-46.
 23. Scimone ML, Aifantis I, Apostolou I, von Boehmer H, von Andrian UH. A multistep adhesion cascade for lymphoid progenitor cell homing to the thymus. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006; 103: 7006-11.
 24. Zlotnik A. Chemokines and cancer. *Int J Cancer.* 2006; 119: 2026-9.
 25. Ghadjar P, Coupland SE, Na IK, Noutsias M, Letsch A, Stroux A, Bauer S, BuhrHJ, Thiel E, Scheibenbogen C, Keilholz U. Chemokine receptor CCR6 expression level and liver metastases in colorectal cancer. *J Clin Oncol.* 2006; 24: 1910-6.

26. Mashino K, Sadanaga N, Yamaguchi H, et al. Expression of chemokine receptor CCR7 is associated with lymph node metastasis of gastric carcinoma. *Cancer Res.* 2002; 62:2937-44.
20. Zerneck A, Liehn EA, Gao JL, Kuziel WA, Murphy PM, Weber C. Deficiency in CCR5 but not CCR1 protects against neointima formation in atherosclerosis-prone mice: involvement of IL-10. *Blood.* 2006;107:4240-33.
21. Crane IJ, Xu H, Manivannan A, McKillop-Smith S, Lamont G, Wallace C, et al. Effect of anti-macrophage inflammatory protein-1 α on leukocyte trafficking and disease progression in experimental autoimmune uveoretinitis. *Eur J Immunol.* 2003;33:402-10.
22. Basolo F, Calvo S, Fiore L, Conaldi PG, Falcone V, Toniolo A. Growth-stimulating activity of interleukin 6 on human mammary epithelial cells transfected with the int-2 gene. *Cancer Res.* 1993;53:2957-60.
23. Cataisson C, Pearson AJ, Tsien MZ, Mascia F, Gao JL, Pastore S, et al. CXCR2 ligands and G-CSF mediate PKC α -induced intraepidermal inflammation. *J Clin Invest.* 2006;116:2757-66.
24. Hong KH, Ryu J, Han KH. Monocyte chemoattractant protein-1-induced angiogenesis is mediated by vascular endothelial growth factor-A. *Blood.* 2005;105:1405-7.
25. Ghadjar P, Coupland SE, Na IK, Noutsias M, Letsch A, Stroux A, Bauer S, Buhr HJ, Thiel E, Scheibenbogen C, Keilholz U. Chemokine receptor CCR6 expression level and liver metastases in colorectal cancer. *J Clin Oncol.* 2006 ; 24: 1910-6.
26. McCarthy JB, Hagen ST, Furcht LT. Human fibronectin contains distinct adhesion- and motility-promoting domains for metastatic melanoma cells. *J Cell Biol.* 1986;102:179-88.

27. Chun JH, Kim HK, Kim E, Kim IH, Kim JH, Chang HJ, et al. Increased expression of metallothionein is associated with irinotecan resistance in gastric cancer. *Cancer Res.* 2004;64: 4703-6.
28. Lee JH, Welch DR. Suppression of metastasis in human breast carcinoma MDA-MB-435 cells aftertransfection with the metastasis suppressor gene, KiSS-1. *Cancer Res.* 1997; 57: 2384-7.
29. Bao L, Loda M, Janmey PA, Stewart R, Anand-Apte B, Zetter BR. Thymosin beta 15: a novel regulator of tumor cell motility upregulated in metastatic prostate cancer. *Nat Med.* 1996;2:1322-8.
30. Udayakumar TS, Chen ML, Bair EL, Von Bredow DC, Cress AE, Nagle RB, et al. Membrane type-1-matrix metalloproteinase expressed by prostate carcinoma cells cleaves human laminin-5 beta3 chain and induces cell migration. *Cancer Res.* 2003 63:2292-2299.
31. Azuma H, Ehata S, Miyazaki H, Watabe T, Maruyama O, Imamura T, et al. Effect of Smad7 expression on metastasis of mouse mammary carcinoma JygMC(A) cells. *J Natl Cancer Inst.* 2005;97:1734-46.
32. Mori M, Mimori K, Shiraishi T, Fujie T, Baba K., Kusumoto M, et al. Analysis of MT1-MMP and MMP2 expression in human gastric cancers. *Int. J. Cancer.* 1997;74: 316-21.
33. Mori M, Mimori K, Shiraishi T, Tanaka S, Ueo H, Sugimachi K, et al. p27 expression and gastric carcinoma. *Nat. Med.* 1997;3:593.
34. Sokobe M, Hawighorst T, Jackson DG, Prevo R, Janes L, Velasco P, et al. Induction of tumor lymphangiogenesis by VEGF-C promotes breast cancer metastasis. *Nat. Med.* 2001;7:

- 192-8.
35. Staller P, Sulitkova J, Lisztwan J, Moch H, Oakeley EJ, Krek W. Chemokine receptor CXCR4 downregulated by von Hippel-Lindau tumor suppressor pVHL. *Nature* 2003;425: 307-11
 36. Karnoub AE, Weinberg RA. Chemokine networks and breast cancer metastasis. *Breast Dis.* 2006-2007; 26: 75-85.
 37. Ohshima K, Tutiya T, Yamaguchi T, Suzuki K, Suzumiya J, Kawasaki C, et al. Infiltration of Th1 and Th2 lymphocytes around Hodgkin and Reed-Sternberg (H&RS) cells in Hodgkin disease: Relation with expression of CXC and CC chemokines on H&RS cells. *Int J Cancer.* 2002;98:567-72.
 38. van den Berg A, Visser L, Poppema S. High expression of the CC chemokine TARC in Reed-Sternberg cells. A possible explanation for the characteristic T-cell infiltrate in Hodgkin's lymphoma. *Am J Pathol.* 1999 Jun;154(6):1685-91.
 39. Ishida T, Iida S, Akatsuka Y, Ishii T, Miyazaki M, Komatsu H, et al. The CC chemokine receptor 4 as a novel specific molecular target for immunotherapy in adult T-Cell leukemia/lymphoma. *Clin Cancer Res.* 2004;10:7529-39.
 40. Su S, Mukaida N, Wang J, Zhang Y, Takami A, Nakao S, et al. Inhibition of immature erythroid progenitor cell proliferation by macrophage inflammatory protein-1alpha by interacting mainly with a C-C chemokine receptor, CCR1. *Blood.* 1997;90:605-11.
 41. Bernhagen J, Krohn R, Lue H, Gregory JL, Zernecke A, Koenen RR, Dewor M, Georgiev I, Schober A, Leng L, Kooistra T, Fingerle-Rowson G, Ghezzi P, Kleemann R, McColl SR, Bucala R, Hickey MJ, Weber C. MIF is a noncognate ligand of CXC chemokine receptors in inflammatory and atherogenic cell recruitment. *Nat Med.* 2007; 13: 587-596.

42. Ao M, Franco OE, Park D, Raman D, Williams K, Hayward SW. Cross-talk between Paracrine-Acting Cytokine and Chemokine Pathways Promotes Malignancy in Benign Human Prostatic Epithelium. *Cancer Res.* 2007 May 1;67(9):4244-53.
43. Rahman KM, Sarkar FH, Banerjee S, Wang Z, Liao DJ, Hong X, Sarkar NH. Therapeutic intervention of experimental breast cancer bone metastasis by indole-3-carbinol in SCID-human mouse model. *Mol Cancer Ther.* 2006; 5: 2747-56.
44. Kim EJ, Hess S, Richardson SK, Newton S, Showe LC, Benoit BM, et al. Immunopathogenesis and therapy of cutaneous T cell lymphoma. *J Clin Invest.* 2005;115:798-812.
45. Yoshie O, Fujisawa R, Nakayama T, Harasawa H, Tago H, Izawa D, et al. Frequent expression of CCR4 in adult T-cell leukemia and human T-cell leukemia virus type 1-transformed T cells. *Blood.* 2002;99:1505-11.
46. Broxmeyer HE, Orschell CM, Clapp DW, Hangoc G, Cooper S, Plett PA, et al. Rapid mobilization of murine and human hematopoietic stem and progenitor cells with AMD3100, a CXCR4 antagonist. *J Exp Med.* 2005;201:1307-18.
47. Steffens S, Veillard NR, Arnaud C, Pelli G, Burger F, Staub C, et al. Low dose oral cannabinoid therapy reduces progression of atherosclerosis in mice. *Nature.* 2005;434:782-6.
48. Devine SM, Flomenberg N, Vesole DH, Liesveld J, Weisdorf D, Badel K, et al. Rapid mobilization of CD34+ cells following administration of the CXCR4 antagonist AMD3100 to patients with multiple myeloma and non-Hodgkin's lymphoma. *J Clin Oncol.* 2004;22:1095-102.

Abstract

Chemokines in gastric cancer metastasis

Jun Ho Lee

*Department of Medicine
The Graduate School, Yonsei University*

(Directed by Professor Sung Hoon Noh)

There is increasing evidence that chemokines and chemokine receptors are casually involved in cancer metastasis. However, little is known about the possible role of chemokine receptors in gastric cancer metastasis. We here report that gastric cancer cells have CC chemokine receptors, CCR4, and that CCL17, a ligand of CCR4, that promote migration and proliferation, of gastric cancer cells that express its cognate receptor CCR4. CCR4 positive patients experienced tumor recurrence more than those with CCR4 negative. Logistic regression analysis showed that CCR4 positive adding to depth of tumor invasion and lymph node metastasis were independant risk factors for recurrence. Our findings suggest that the existence of CCR4, and its migration, may represent an important mechanism underlying metastasis of gastric cancer.

Key Words : chemokine, gastric cancer, metastasis