

전이대장암의 Osteopontin 및 MMP-1
유전자의 발현 변화

연세대학교 대학원

의과학과

최준정

전이대장암의 Osteopontin 및 MMP-1
유전자의 발현 변화

지도교수 김호근

이 논문을 석사 학위논문으로 제출함

2008 년 6 월

연세대학교 대학원

의과학과

최준정

최준정 의 석사 학위논문 을 인준함

심사위원 _____ 인

심사위원 _____ 인

심사위원 _____ 인

연세대학교 대학원

2008 년 6 월

감사의 글

석사 논문을 마무리 하며 부족함이 많은 제가 석사 논문을 완성하기 까지 많은 분들에게서 도움을 주셨다는 생각을 하며 감사의 말씀을 전합니다. 오래 전에 시작한 석사학위를 여러 경험 끝에 수년 후 끝내게 되는데 많은 도움을 주신 여러 선생님들, 특히 다시 공부를 할 수 있는 열정을 일깨워 주신 김호근 선생님, 꼼꼼히 원고를 봐주시면서 관심을 주셨던 박전한 선생님, 따뜻한 격려 주셨던 김남규 선생님께 감사 드립니다. 다른 동기들 보다 늦게 수련을 시작하여 부족함이 많은 저에게 많은 기회를 주시는 병리학교실 이광길, 김태승, 양우익, 조남훈, 박영년 선생님께 감사 드립니다. 특히, 해외 연수 중에도 학위 과정과 수련 생활에 많은 격려와 충고 주셨던 김세훈 선생님께도 감사 말씀 전합니다.

의국 생활을 함께 하는 좋은 동료들 선,후배 모두에게도 감사 드리고, 특히 머리를 맞대고 초여름을 불태우며 석사학위를 함께 마무리한 김상겸 전공의에게 고마움을 전합니다. 마지막으로 저를 아끼는 가족들에게 고마운 마음을 지면을 빌어 전하고, 웃음과 눈물로 사소한 설렘을 준 사람들, 솔직한 이야기들을 들어준 사람들, 하나가 될 수는 없었지만 한번도 둘이라고 느끼게 해주지 않은 사람들의 고마운 이름들을 떠올려 봅니다.

2008년 6월

저자 씀

<차례>

국문요약	1
I. 서론	2
II. 재료 및 방법	6
1. 환자군 설정 및 임상 정보 수집	6
2. Tissue microarray의 제작	6
3. 면역 조직 화학 염색	7
4. 통계학적 분석	8
III. 결과	11
1. Osteopontin의 원발성 대장암 조직, 전이성 대장암 조직에서의 발현 양상	11
2. MMP-1의 원발성 대장암 조직, 전이성 대장암 조직에서의 발현 양상	13
3. Serpin A1의 원발성 대장암 조직, 전이성 대장암 조직에서의 발현양상	15
4. Osteopontin의 발현과 혈관 침습 및 림프절 전이와의 관계	17
5. MMP-1 발현과 혈관침습 및 림프절전이와의 관계	19
6. Osteopontin 및 MMP-1의 발현변화, 원발종양의 혈관침습과 림프절 전이와 생존률과의 관계	20
IV. 고찰	22

V. 결론	31
참고문헌	32
영문요약	37

그림 차례

Figure 1. Immunohistochemical staining result of Osteopontin expression in primary and metastatic colorectal carcinomas. 11

Figure 2. Immunohistochemical staining result of MMP-1 expression in primary and metastatic colorectal carcinoma. 13

Figure 3. Immunohistochemical staining result of Serpin A1 expression in primary and metastatic colorectal carcinoma. 15

Figure 4: Survival analysis of 43 patients according to the lymph node metastasis status, lymphovascular permeation, Osteopontin and MMP-1 expression. 21

표 차례

Table 1. Clinicopathologic profiles of 43 colon cancer patients. . . 9

Table 2. Lymphovascular permeation and nodal metastasis with regards to Osteopontin and MMP-1 expression. 18

<국문요약>

전이대장암의 Osteopontin 및 MMP-1 유전자의 발현 변화

전이는 악성종양의 주요 특징으로서 각종 암의 예후와 관련된 가장 중요한 인자로 알려져 있다. 전이과정은 다단계로 이루어지고, 따라서 각 단계를 구성하고 조절하는 유전자적 변화와 유전자 산물의 변화 역시 매우 다양할 것으로 생각된다. 연구자들은 이전에 원발성 대장암과 전이 대장암 조직에서 19,000개 유전자의 human oligonucleotide microarray를 통하여 유전체 발현 양상을 검정하여 원발성 대장암과 전이 대장암 사이에 약 80여개의 다르게 표현되는 유전자를 발굴한 바 있다. 밝혀진 80여 개의 유전자 중 많은 부분은 기존에 알려진 종양의 전이관련 행태와 관련 있을 것으로 추정되는 것들로, 세포 내외 기질의 합성과 분비, turn over 등에 관련되는 물질이었으며, 이들 중 일부는 종양 생성과 전이 등에 관련이 있음이 타 종양에서도 발견되어 장기와 관련 없이 암종의 전이에 공통적으로 관여할 것으로 추정되었다. 전이의 임상적 의의를 고려해 보았을 때, 이들의 발현 및 조절 양상을 이해하는 것은 필수적인 일이다. 본 연구에서는 이들 중 Osteopontin, MMP-1, serpin A1의 발현을 동일 환자에서 발생한 검증용 원발성 대장암과 전이 대장암 43세트를 대상으로 면역조직화학염색을 실시하였으며, 이들 중 Osteopontin과 MMP-1이 원발성 대장암과 전이 대장암에서 발현의 차이를 보였다. 따라서 Osteopontin과 MMP-1은 전이 대장암에서 발현이 차이가 나는 중요한 유전자로서 이의 임상적 응용에 관한 연구가 필요하다.

핵심되는 말: 원발성 대장암, 전이 대장암, oligonucleotide microarray, 면역조직화학염색, osteopontin, MMP-1

전이대장암의 Osteopontin 및 MMP-1 유전자의 발현 변화

<지도교수 김 호 근>

연세대학교 대학원 의과학과

최 준 정

I. 서론

전이(metastasis)는 원발암과 떨어져 있는 종양 임플란트로, 종양을 악성종양으로 구분 짓는 주요 가장 중요한 성질 중 하나로 알려져 있다. 기본적으로 몇 가지 예외적인 경우(중추신경계의 신경아교세포암과 피부의 기저세포암)를 제외하고 모든 악성종양은 전이한다¹. 종양의 국소 침습(local tissue invasion)과 전이는 개별적인 성상이지만, 분자생물학적 수준에서 두 가지는 연속선상에 있다고 생각된다. 일반적으로 원발종양이 나쁜 생물학적 행태를 보일 때, 전이가 동반된다고 생각되나, 원발종양의 크기가 작고, 분화가 좋은 경우에서도 전이는 이루어질 수 있으며, 반대로 원발종양이 매우 나쁜 생물학적 행태를 보이는 경우에도 전이가 이루어지지 않는 경우가 있다¹.

새로 악성 고형암으로 새로이 진단을 받은 환자의 약 30%에서 전이가 동반되고 있으며, 종양의 전이는 완치를 어렵게 하는 가장 중요한 요인이 되고 있다¹. 특히, 대장암의 약 25-35%에서 synchronous, metachronous hematogenous metastasis를 보이며, 이들 중 60-80% 가 간으로의 전이를 보이고 있는데 이들 환자 군의 5년 생존률은 유의하게 낮은 것으로 알려져 있다².

현재까지 전이 발생에 대하여 두 가지 이론이 널리 알려져 있다. 첫째, 유전결정적 모델은, 다단계적 종양발생 과정 중 비교적 후기 단계에 종양을 이루는 세포의 일부가 전이가능 형질을 얻게 되어 이들이 전이하게 된다고 여기고 있다. 또 한 축을 이루는 모델은 비교적 초기단계 혹은 종양발생 때부터 전이형질을 가지고 있다는 이론이다. 두 가지 모델을 지지하는 몇 가지 증거들은 제시되고 있으나, 전이의 임상적 중요성을 미루어 볼 때, 전이성 종양에 대한 분자유전학적 기전과 이와 동반된 병태생리학에 대한 이해는 미흡한 상태라고 할 수 있다^{3, 4}.

최근의 high-throughput technique을 이용한 일련의 연구들은 유전자들의 발현에 따른 종양 아형의 분류가 예후를 예측할 수 있는 인자로의 사용 가능성을 보이고 있다. 또한, 특정 표현형(임상적으로는 재발여부나 치료반응 정도)에 관여하는 유전자들의 발현의 조합, 즉 분자 유전학적 표지자의 조합이 개별 유전자에 대한 연구를 진행하는 것보다 효과적으로

예후를 예측하는 데 도움을 줄 수 있다고 알려져 있다³⁻⁷. 최근에 발전한 기능성 유전체학은 한번의 검사로서 많은 유전자의 발현 정도를 알아 볼 수 있게 하여, 일반적으로 병태생리학적으로 복잡다단한 분자유전학적 변화를 보이는 질환, 특히 암이나 자가면역질환 등의 이해를 연구하는데 주요한 방법론으로 제시되고 있으며, 대장암과 같이 다단계적이며 복합적인 종양발생단계를 거친다고 생각되는 종양의 발생기전은 물론, 전이와 같이 악성종양의 특성을 이해하는데 매우 유용한 수단이라고 제시되고 있다.

연구자들은 최근에 oligonucleotide microarray 실험을 통하여 전이성 대장암에서 원발종양과 다르게 발현되는 80여개의 유전자들을 발굴하였다⁸. 이 연구에서는 12세트의 동일 환자에서 발생한 정상-원발대장종양-전이성암의 유전자 발현양상을 19,000개 유전자의 human oligonucleotide microarray를 통하여 two-way hierarchical clustering을 하여 분석하였으며, 이 분석에서 molecular profiling에 따라 원발 종양과 정상 대장 조직은 구분이 되었으나, 원발 종양과 전이 종양이 확연히 구분되지는 않는 것으로 나타났다. 그러나, multi-dimensional scaling을 시행하였을 때 원발 종양과 전이 종양에서 다른 유전자 발현 양상을 보이며, 이에 따라 원발-전이종양간 다르게 발현되고 조절되는 유전자들을 발굴하였다. 이 연구에서 정상 대장점막 조직과 다르게 발현되는 유전자는

원발성 종양과 전이성 종양에서 각각 1,222개와 1,079개였으며, 이들 중 약 60%를 차지하는 767개는 두 그룹에서 공통적으로 발현되어 되었다. 이 연구에서 Mann-Whiney rank-sum test를 통한 supervised analysis를 통하여 원발 및 전이 종양에서 공통적으로 발현되는 767개의 유전자중 전이 종양에서 다르게 발현되는 유전자 80여 개를 선별하였다⁸. 이 결과는 기본적으로는 원발종양과 전이종양에서 유사한 유전자 발현 양상을 보이나, 다르게 발현, 조절되는 유전자들이 종양의 전이에 관여할 가능성이 있음을 시사한다. 따라서, 이들 전이 특이 유전자들의 분자 생물학적, 조직학적 표현형을 이해하는 것은 악성종양의 전이와 예후인자의 이해에 도움을 줄 수 있을 것이다. 본 연구에서는 이들 80여 개의 유전자 중 특히, 최근까지 이루어진 연구를 통하여 대장암 발생관련, 혹은 대장암의 진행 및 전이관련 행태와 밀접하게 관련 있다고 생각되는 Osteopontin, Matrix metalloprotease-1 (MMP-1), Serpin A1 등의 3개의 유전자 산물의 발현을 면역조직화학염색을 통하여 검사하고자 하였다. 연구 대상으로서는 검증용 자료로서 새로 수집한 43 명의 환자군의 원발종양-전이종양 조직에서 관찰하여, 이들이 종양의 전이과정 이해 및 전이 예측에 도움이 될 수 있는가를 검증하고자 하였다.

II. 재료 및 방법

1. 환자군 설정 및 임상 정보 수집

2000년부터 2007년까지 연세대학교 의과대학 부속 신촌 세브란스 병원에서 원발성 대장암 및 전이성 대장암을 진단받아 원발암 및 전이암 모두를 치료한 환자를 대상으로 하였다. 각 예마다 짝지은 두 종양의 파라핀 포매 조직을 사용할 수 있는 총 43명의 환자를 대상으로 연구를 진행하였다. 환자의 임상 기록지를 참고하여 진단 당시의 나이, 성별, 원발성 종양과 전이성 종양의 진단 시기, 치료여부 등을 검색하였다. 43례 중 원발종양과 전이종양이 함께 발견된 례는 26례였으며, 원발종양 절제 후 전이 종양이 발견되어 수술한 례는 17례였으며, 원발종양 진단 후 전이종양 진단까지의 시간은 평균 18개월이었다(범위: 6개월- 43개월). 환자의 임상자료는 Table 1에 요약하였다. 각 환자의 조직의 실험적 사용을 위한 피험자 동의와, 임상 윤리 위원회의 허가를 얻었다.

2. Tissue microarray의 제작

10% 중성 포르말린에 12시간 이상 고정 후 일련의 과정을 거쳐 파라핀에 포매하여 보관된 조직을 이용하였고, 각 증례의 대표적인 파라핀 블록의 종양조직에서 조직 심(tissue core)을 취하여 tissue microarray를 제작하였다. 조직 심의 직경은 2.0 mm로 하고, 하나의 파라핀 블록에 최대 48개의 조직 심이 포함되도록 제작하였다. 추출 오차를 최소화하기 위하여

한 증례 당 2개 이상의 조직 심을 취하였다.

3. 면역 조직 화학 염색

Tissue microarray slide는 4-5 μm 의 연속 절편으로 박절하여 오븐에서 파라핀을 녹인 후 자일렌으로 파라핀을 완전히 제거하였다. 에틸 알코홀로 단계적으로 함수하였고, 조직 절편을 0.3% 과산화수소수에 10분간 담근 후 pH 6.0의 구연산 완충액에 담가 극초단파에 15분간 처리한 후 실온에서 식혔다. 희석된 일차 항체인 항 MMP-1 (1:200, Calbiochem, La Jolla, CA, USA), SerpinA1 (1:200, AVIVA Systems Biology, San Diego, CA, USA), Osteopontin (1:200, Abcam Plc. Cambridge, UK) 항체를 상온에서 약 30분간 반응시킨 후 냉장고에서 12시간 배양하였다. EnVision kit (Dako, Tokyo, Japan)을 이용한 EnVision 항체 복합체 방법으로 면역과산화효소염색을 시행하였다. 3,3-diaminobenzidine tetrachloride chromogen으로 발색한 후 Meyer's Hemalum solution (hematoxylin)으로 대조염색하였다. 면역조직화학염색의 판독은 cut-off value 를 30%로 잡아, 30% 이상의 종양세포에서 세포막 혹은 세포질에 염색되는 것을 양성으로 판독하였으며, 정상 대장조직에 발현되는 정도를 mild로 잡았을 때, mild, moderate, strong expression을 각각 1, 2, 3, 그리고 음성을 0으로 판독하였다. 면역조직화학 염색은 각 2회 이상 실시하였으며, 총 관찰 수의 평균값을 대표 값으로 사용하였다.

4. 통계학적 분석

SPSS verion 12 프로그램 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA)를 이용하여 원발종양과 전이종양의 Osteopontin, MMP-1, SerpinA1의 발현을 Wilcoxon 부호 순위검정을 이용하였으며, Osteopontin의 발현과 혈관침습, 림프절 전이와의 관계는 chi-square 검정으로 분석하였다. 원발종양 절제 후 발생한 전이종양 환자군에서 Osteopontin의 발현 차이가 있는 환자군과 차이가 없는 환자군에서 재발까지의 시간의 비교는 교차 분석을 시행하였다. Osteopontin의 발현과 생존율과의 분석을 위하여 Kaplan-Meier method의 log-rank 검정을 이용하여 단변량 분석하였다. 생존기간은 진단 당시 날짜로부터 대장암으로 인한 사망일까지를 개월로 계산하였다.

Table 1. Clinicopathologic profiles of 43 colon cancer patients.

Case number	Sex	Age	Site		Differentiation		Tumor size (maximal dimension in cm)		Relapse interval	Metastasis type	Node metastasis
			Primary	Meastatic	Primary	Metastatic [§]	Primary	Metastatic			
Met-1	F	56	Rectum	Lung	Moderate	Moderate	4.8	4	21	Metachronous	0/18
Met-2	M	60	Rectosigmoid	Liver	Moderate	Moderate	3.4	6	14	Metachronous	8/14
Met-3	F	67	Rectum	Liver	Moderate	Moderate	6.1	5.5	8	Metachronous	8/19)
Met-4	F	41	Rectum	Liver	Moderate	Moderate	6.0	2.0	25	Metachronous	5/32
Met-5	F	68	Sigmoid	Liver	Moderate	Moderate	4.0	5.5	43	Metachronous	0/6
Met-6	M	62	Sigmoid	Liver	Moderate	Moderate	2.0	2.2	11	Metachronous	1/12
Met-7	M	52	Sigmoid	Lung	Moderate	Moderate	4.8	3.0	38	Metachronous	1/8
Met-8	M	70	Sigmoid	Liver	Moderate	Moderate	3.8	1.2	26	Metachronous	3/6
Met-9	F	67	Ascending	Liver	Moderate	Moderate	13.4	1.6	6	Metachronous	6/43
Met-10	F	61	Sigmoid	Liver	Moderate	Moderate to poor	4.7	6.0	6	Metachronous	0/6
Met-11	M	55	Ascending	Liver	Well	Moderate	5.3	8.0	15	Metachronous	4/46
Met-12	F	44	Ascending	Liver	Moderate	Poor	N/A §	4.5	8	Metachronous	9/29
Met-13	M	61	Ascending	Liver	Well	Moderate	1.7	2.0	24	Metachronous	2/19
Met-14	F	57	Sigmoid	Liver	Moderate	Moderate	5.0	2.2	16	Metachronous	6/28
Met-15	F	53	Sigmoid	Lung	Moderate	Moderate	4.0	2.5	25	Metachronous	2/12
Met-16	F	57	Ascending	Lung	Moderate	Moderate	5.5	0.7	12	Metachronous	2/21
Met-17	M	45	Sigmoid	Liver	Moderate	Moderate	5.0	2.5	14	Metachronous	6/19
Met-19	F	56	Rectum	Liver	Moderate	Moderate	3.5	3.0		Synchronous	0/9
Met-20	M	60	Rectum	Liver	Moderate	Moderate	4.0	1.8		Synchronous	0/8
Met-22	M	69	Rectum	Liver	Moderate	Moderate	5.2	2.0.		Synchronous	7/20
Met-23	M	51	Rectum	Liver	Moderate	Moderate	6.5	1.5		Synchronous	0/21
Met-24	F	62	Rectum	Liver	Moderate	Moderate	4.0	3.7		Synchronous	1/10
Met-25	M	70	Sigmoid	Liver	Moderate	Moderate	3.3	4.0		Synchronous	2/11
Met-26	M	67	Rectum	Liver	Moderate	Moderate	5.3	6.0		Synchronous	51/61
Met-27	M	72	Rectum	Liver	Moderate	Moderate	4.5	3.0		Synchronous	0/6
Met-28	F	48	Ascending	Liver	Moderate	Moderate	3.5	2.3		Synchronous	8/52
Met-29	M	46	Rectum	Liver	Moderate	Moderate	2.5	2.4		Synchronous	4/12
Met-31	M	62	Sigmoid	Liver	Moderate	Moderate	4.0	1.3		Synchronous	1/31
Met-32	F	65	Rectum	Liver	Moderate	Moderate	4.5	1.3		Synchronous	6/19
Met-33	F	60	Sigmoid	Liver	Moderate	Moderate	5.0	1.6		Synchronous	0/32

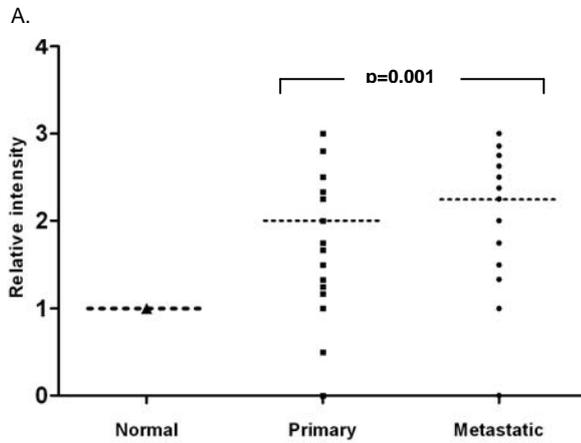
Met-34	F	54	Sigmoid	Liver	Moderate	Moderate	6.0	1.3	Synchronous	6/54
Met-35	F	60	Sigmoid	Liver	Moderate	Moderate	5.5	2.5	Synchronous	12/33
Met-36	F	72	Sigmoid	Liver	Moderate	Moderate	7.5	2.2	Synchronous	0/12
Met-37	M	53	Sigmoid	Liver	Moderate	Moderate	6.0	1.5	Synchronous	2/35
Met-38	M	52	Sigmoid	Liver	Moderate	Moderate	5.0	5.0	Synchronous	2/38
Met-39	F	40	Sigmoid	Liver	Moderate	Moderate	5.4	3.0	Synchronous	1/22
Met-40	M	61	Rectum	Liver	Moderate	Moderate	5.3	1.6	Synchronous	0/20
Met-41	M	53	Cecum	Liver	Moderate	Moderate	4.2	1.5	Synchronous	6/17
Met-42	M	69	Ascending	Liver	Well	Well	6.0	0.7	Synchronous	2/41
Met-43	F	48	Rectum	Liver	Moderate	Moderate	4.3	3.0	Synchronous	9/33
Met-44	M	57	Ascending	Liver	Moderate	Moderate	8.4	1.7	Synchronous	0/20
Met-45	F	60	Sigmoid	Liver	Moderate	Moderate	7.0	7.5	Synchronous	4/32
Met-46	M	67	Rectum	Liver	Moderate	Moderate	3.5	4.5	Synchronous	3/19

[§] N/A = not available

III. 결과

1. Osteopontin의 원발성 대장암 조직, 전이성 대장암 조직에서의 발현 양상

총 43례의 원발성 대장암 조직-전이성 대장암 조직에서 Osteopontin의 발현을 관찰하였다. 이 중 27례에서 전이성 대장암 조직에서 Osteopontin의 발현이 원발종양에서 보다 높게 나타났다. 두 군의 Osteopontin 발현을 Wilcoxon signed rank test로 검정하였을 때, 원발-전이의 발현차가 음인 순위의 합은 518.5 였으며, 양인 순위의 합은 111.5였다. 따라서 Osteopontin이 전이성 대장암 조직은 원발성 대장암 조직암에서 더 많이 발현되며 이러한 차이는 통계적으로도 유의하였다. (p=0.001, Figure 1,)



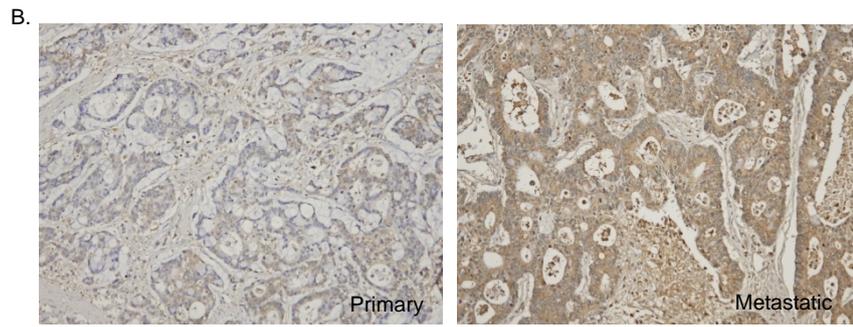


Figure 1. Osteopontin expression in primary and metastatic colorectal carcinomas (x 100). A. Osteopontin expression is increased in metastatic carcinoma ($p=0.001$) B. An example of immunohistochemical staining result of Osteopontin expression in matched primary and metastatic carcinomas. More intense expression is noted in cells of metastatic carcinoma.

2. MMP-1의 원발성 대장암 조직, 전이성 대장암 조직에서의 발현 양상

총 43례의 원발성 대장암 조직-전이성 대장암 조직에서 MMP-1의 발현을 관찰하였다. 두 군의 MMP-1 발현을 Wilcoxon signed rank test로 검정하였을 때, 원발-전이의 발현차가 차가 음인 순위의 합은 198였으며, 양인 순위의 합은 582였다. 따라서 MMP-1의 발현은 전이성 대장암 조직에서 원발성 대장암 조직보다 감소하며, 이러한 차이는 통계적으로도 유의하였다 ($p=0.007$, Figure 2,).

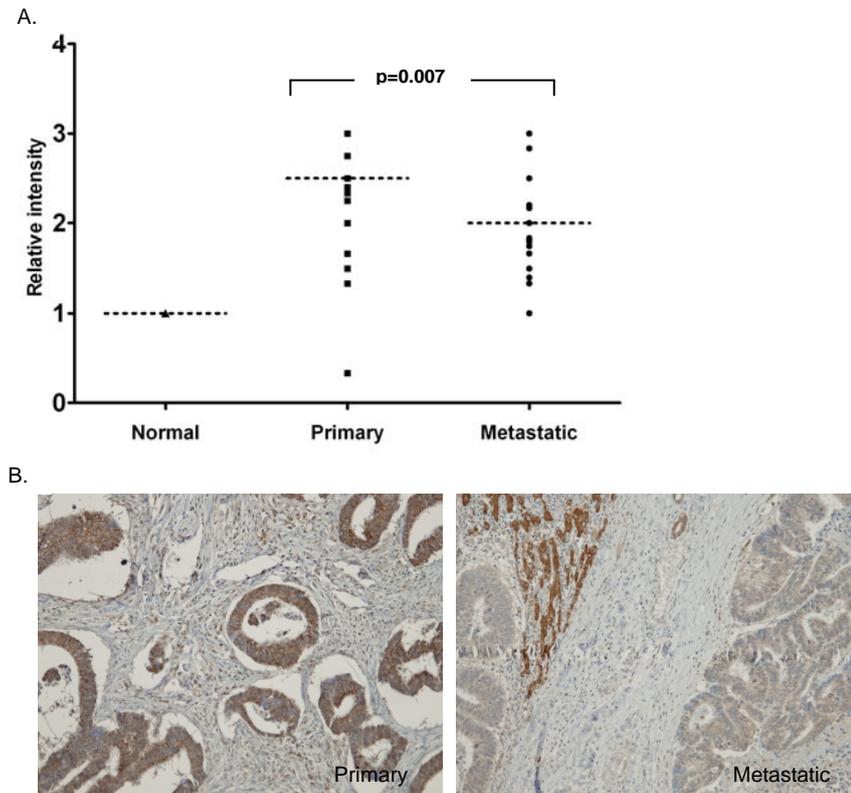


Figure 2. MMP-1 expression in the primary and metastatic colorectal carcinomas(x100) A. MMP-1 expression is decreased in metastatic carcinoma (p=0.007). B. An example of immunohistochemical staining results of MMP-1 expression in matched primary and metastatic carcinomas. More intense expression is noted in cells of primary carcinoma.

B.

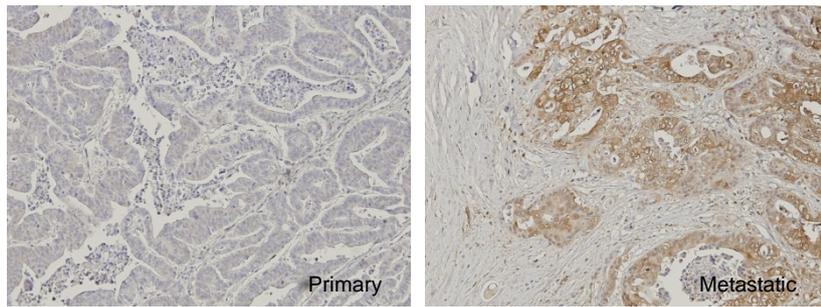


Figure 3. Serpin A1 expression in the primary and metastatic colorectal carcinomas(x100). A. There is no difference of Serpin A1 expression between both groups ($p=0.739$).B. An example of immunohistochemical staining result of Serpin A1 in a matched primary and metastatic carcinomas. Similar expression of primary and metastatic carcinomas are seen.

4. Osteopontin의 발현과 혈관 침습 및 림프절 전이와의 관계

Osteopontin의 발현이 전이암에서 증가한 것으로 나타났으며, 이것이 분비성 당단백인 점을 고려하여 Osteopontin의 발현이 조직학적 표지자로서 적절한 지를 판별하기 위하여, Osteopontin의 발현이 증가한 군과 그렇지 않은 군을 나누어 이들의 원발종양에서 혈관침습 및 림프절 전이양상을 분석하였다.

혈관침습이 있던 증례는 총 17례였으며, 이 중 Osteopontin의 발현이 증가한 집단에 속한 증례는 12례였으며, 그렇지 않은 집단에 속한 증례는 5례로, Osteopontin 발현이 증가한 집단이 더 많은 혈관침습을 보였다. 그러나 이러한 차이는 Fisher' s exact 검정을 시행하였을 때 통계적으로 유의하지는 않았다 ($p= 0.523$, Table 2).

림프절 전이가 있는 증례는 총 31례였으며, 이 중 Osteopontin의 발현이 증가한 집단에 속하는 증례는 20례였고, 그렇지 않은 집단에 속한 증례는 11례로, 림프절 전이가 있는 증례 중 Osteopontin의 발현이 증가한 증례수가 많았다 그러나 이러한 차이는 Fisher' s exact 검정을 시행하였을 때 통계적으로 유의하지는 않았다 ($p= 0.737$, Table 2).

또한 metachronous 전이종양환자군에서 Osteopontin 발현이 증가한 군과 발현이 감소, 혹은 변화가 없던 환자군에서 전이종양 발생의 interval의 차이가 있는지를 분석하였다. 총 18례가 metachronous 전이종양을

나타냈으며, 전체 평균 18개월 후 종양의 재발로 전이종양이 나타났다. 이들 중 Osteopontin 발현의 증가가 있던 군은 평균 20.9 개월 후 재발성 전이암이 발생하였으며, Osteopontin 발현의 증가가 나타나지 않은 집단은 평균 16.3개월 후 재발성 전이암이 발생한 것으로 나타났으나, 두 집단간의 차이에 대한 교차분석을 시행하였을 때 이러한 차이는 통계적으로 유의하지 않았다 ($p=0.388$).

Table 2. Lymphovascular permeation and nodal metastasis with regards to Osteopontin and MMP-1 expression.

		Osteopontin expression				MMP-1 expression			
		Increased	Not increased	Total	p-value	Decreased	Not decreased	Total	p-value
Lymphovascular permeation	Present	12	5	17	0.523	16	10	26	0.859
	Absent	15	11	26		10	7	17	
Lymph node metastasis	Present	20	11	31	0.737	8	18	26	0.48
	Absent	7	5	12		3	14	17	

5. MMP-1 발현과 혈관침습 및 림프절전이와의 관계

MMP-1의 발현이 전이종양에서 원발종양에 비하여 낮은 것으로 나타났으므로, 이러한 양상이 혈관침습 및 림프절 전이여부와 관련이 있는지를 분석하였다.

혈관침습이 있었던 증례는 총 26례였으며, 이중 MMP-1의 발현이 원발종양보다 전이종양에서 감소한례는 16례로, MMP-1의 발현이 감소하지 않은례보다 많았다. 그러나 이러한 결과는 통계적으로 유의하지 않았다($p=0.859$, Table 2).

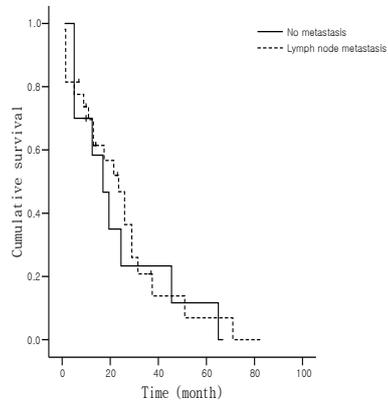
림프절 전이가 있었던 증례는 총 26례였으며, 이중 MMP-1의 발현이 원발종양보다 전이종양에서 감소한례는 8례로, MMP-1의 발현이 감소하지 않은례보다 적었다. 그러나 이러한 결과는 통계적으로 유의하지 않았다($p=0.480$, Table 2).

6. Osteopontin 및 MMP-1의 발현 변화, 원발종양의 혈관침습과 림프절 전이와 생존률과의 관계

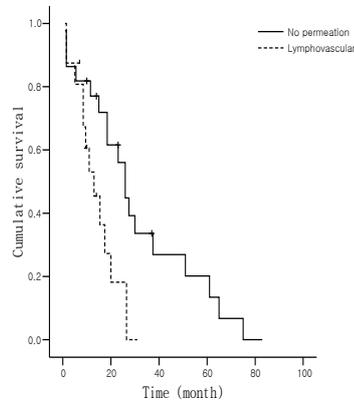
Osteopontin 발현의 증가가 있는 집단과 증가가 없는 집단간의 생존률의 차이가 있는가의 여부를 Kaplan Meyer method의 log-rank 검정으로 단변량 분석을 시행하였다. 추적기간 중 Osteopontin 발현증가가 있는 집단의 생존율이 낮은 경향을 보였지만 통계적으로 유의하지는 않았다 ($p=0.9174$, Figure 4).

MMP-1 발현의 감소가 있는 집단과 증가가 없는 집단간의 생존률의 차이가 있는가의 여부를 Kaplan Meyer method의 log-rank 검정으로 단변량 분석을 시행하였다. 추적기간 중 MMP-1 발현감소가 있는 집단의 생존율이 높은 경향을 보였지만 통계적으로 유의하지는 않았다 ($p=0.6704$, Figure 4).

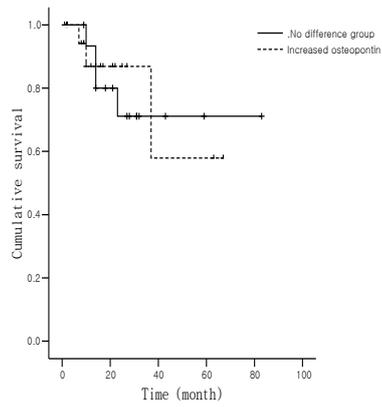
대상 환자군의 혈관침습과 림프절 전이여부와 생존률과의 관계를 Kaplan Meyer method의 log-rank 검정으로 단변량 분석을 시행하였다. 혈관침습이 있는 경우가 없는 경우보다 생존율이 높은 것으로 나타났으며, 이러한 결과는 통계적으로 유의하였다 ($p=0.01$). 그러나 림프절 전이의 경우 전이가 있는 경우 생존율이 더 낮은 것으로 관찰되었으나, 이러한 결과는 통계적으로 유의하지는 않았다 ($p=0.9418$, Figure 4).



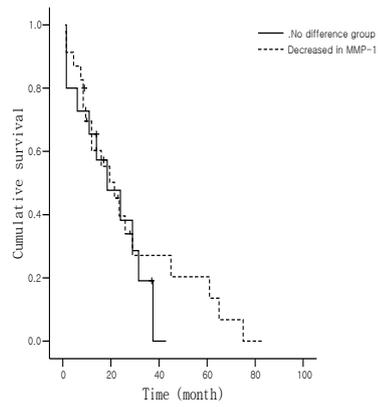
Lymph node metastasis



Lymphovascular permeation



Osteopontin expression



MMP-1 expression

Figure 4: Survival analysis of 43 patients according to the lymph node metastasis status, lymphovascular permeation, Osteopontin, and MMP-1 expression. No significance difference in survival is noted ($p=ns$).

IV. 고찰

전이(Trans)는 악성종양의 주요한 특징으로, 종양의 악성도를 결정하는데 가장 중요한 요소 중 하나이며, 환자의 생존률과도 밀접한 관계를 가지고 있다. 고형암에서 전이가 이루어지는 과정은 원발암에서 종양세포가 혈관으로 침투하여 혈류에서 생존하여 표적장기에 도달, 표적장기에 침투하여 성장하는 다단계를 거쳐 진행하게 된다. 이러한 과정은 원발종양에 내재된 형질로, 단계적인 유전자 발현과정에 따라 이루어지거나 혹은 종양의 분화과정에서 유전적 변이로 형질을 획득한 종양세포군들이 선택된 결과일 수 있다³. 따라서 이들 과정에서 이루어지는 복잡다단한 유전자 발현의 변화와 조절을 이해하는 것은 종양발생과정과 진행과정의 이해와 종양치료를 위한 연구의 근간이 된다. 그러나 개별 종양이 보이는 유전자발현의 조절과정을 연구하는 것에는 많은 제약이 따르고, 종양발생에 관련하는 각종 교란 변수들에 의한 영향을 배제하기 힘들게 되므로, 대규모 환자 집단에서 관찰되는 유전자 발현의 행태를 관찰하고 유전자 산물의 생물학적 기능을 이해하는 것은 종양발생과 악성종양의 행태 연구에 필수적이다. Microarray 기술과 bioinformatics의 발전으로 개별적인 유전자 변화의 차이에 국한하지 않고, 유전체 발현 연구의 시스템적 접근이 가능하게 되었고, 이에 따라 비교적 유사한 임상양상 혹은 예후를 보이는 환자집단에서 유의미하게 관찰되는 유전자 발현

양상을 이해하여 종양의 분자유전학적 표지자를 이해하는 근간을 마련하였다. 본 연구에서는 선행실험을 통하여 원발성 대장암과 전이성 대장암에서 차이를 보이는 유전자 산물들의 발현을 검증 세트 (validation set)을 대상으로 관찰하였다.

이전의 연구에서는 원발성 대장암과 전이성 대장암에서 많은 경우 유사한 분자유전학적 표지자를 보였으며, 따라서 종양 발생과정에서 상대적으로 초기에 전이관련 형질이 결정될 것으로 해석하였다. 그러나, 이 연구에서도 원발성 대장암과 전이성 대장암에서 80여개의 유전자가 다르게 조절됨이 나타났고, 저자들은 이들의 발현 차이가 종양의 전이관련 행태에 관여할 것임을 제시하였다. 이들 80여개의 유전자들은 기존의 연구를 통하여 밝혀진 세포 성장과 증식에 관여하는 역할을 하는 유전자(GAS1, ITLN1, IL1B)군, 세포외 단백질분해효소(MMP1, MMP2, MMP3, MMP13)와 세포 접착(COL12A1, PAP)과 세포운동성(VIP, WNT 5A)과 관련된 군 등이 포함되어 있다⁸. 이들 유전자의 발현은 전이관련 특이 유전자일 가능성과 함께 전이를 포함한 종양 진행에 대한 인체의 방어 및 종양면역과 관련된 반응물로서 발현되는 것일 가능성 역시 존재한다. 그러나 이들이 종양 발생 및 전이과정에서 발현, 조절되는 양상의 패턴을 이해하는 것은 전이발생의 예측에 도움이 될 수 있으며, 원발성 종양 절제 후 재발 및 전이 발생에 대한 추적관찰의 적절한 지표로서 사용될 수 있다. 특히

대장암에서 재발 혹은 전이를 조기에 발견하여 systemic therapy를 하는 것은 환자의 생존에 매우 중요한 영향을 주는 것으로 알려져 있으므로⁹, 이러한 생물학적 지표의 개발과 이용은 임상적으로 큰 의의를 가지는 일이다. 주목할 만한 점은, 이전의 연구에서 밝혀진 80 여개의 유전자 중 35개의 유전자 산물은 세포 외로 분비되는 분비성 단백질로⁸ 이들의 조직 및 혈중에서의 정량적/정성적 분석은 의의 있는 과제이다.

현재까지 대장암에서 생물학적 표지자로 가장 널리 알려진 것은 암태아항원(carcinoembryonic antigen: CEA)이다. 2006년 American Society of Clinical Oncology (ASCO)가 제시한 가이드 라인은, 수술 전 병기 결정과 치료계획 수립에 도움을 줄 경우 CEA 측정이 필요하며, stage II와 III 환자군에서 systemic therapy를 결정하고 전이발생 여부를 판정하기 위하여 CEA 측정을 요구하고 있다¹⁰. 특히, 전이발생 예측과 전이암 치료의 모니터링의 역할로 CEA의 역할이 인정되고 있다. 그러나 CEA의 낮은 민감도로 인하여 CEA가 대규모 집단에서 screening test로 시행되는 것은 적절하지 않다고 알려져 있다. 그 외 CA 19-9등이 알려져 있으나, 2006년 ASCO 가이드 라인은 CA 19-9가 대장암의 스크리닝, 진단, 병기 결정 및 모니터링에 적절하지 않다고 언급하였다¹⁰.

Osteopontin은 분비성 인당단백질(phosphoglycoprotein)로서 secreted phosphoprotein I (SPP 1), 2ap, early T-lymphocyte activation 1 (Eta-1)

등으로 알려져 있으며, bone sialoprotein, dentin matrix protein 1, dentin sialoprotein, matrix extracellular phosphoglycoprotein 등이 포함되어 있는 small integrin binding ligand N-linked glycoprotein family에 속한다¹¹. Osteopontin은 각종 integrin receptor 및 CD 44와 결합하고, 이를 통하여 cell-matrix interaction과 세포신호전달에 관여 하는 것으로 알려져 있다¹². Osteopontin은 정상적으로 T 림프구, 혈관내피세포, 대식세포, 뼈세포와 피부세포에서 발현되며, 많은 암종에서 발현 및 분비되는 것으로 알려져 있다. 특히, 최근 암전이 조절과 관련된 Osteopontin의 역할에 대한 연구가 진행되고 있다. 현재까지 유방암¹³⁻¹⁵, 위암¹⁶, 폐암^{17, 18}, 전립선암¹⁹, 간암²⁰과 대장암²¹에서 Osteopontin의 발현 증가가 암침습 (invasion), 진행(progression) 및 전이와 관련 있다는 연구가 보고된 바 있다. 특히, 12,000개 인간유전자의 스크리닝 pooled sample expression profiling의 결과로 Osteopontin이 대장암 진행의 주요 표식자로 밝혀진 것은 주목할 만하다²¹. Osteopontin의 전이관련 역할은 여러가지 실험적인 증거를 통하여 연구되었다. Tuck등²²은 재조합 osteopontin이 사람 유선 세포주에서 migration과 침습을 유도함을 보였고, Yoneda등²³은 MDA-MB-231 세포주에서 Osteopontin의 발현증가가 세포의 전이성을 유도함을 보였다. 형질 획득 연구로서, 비전이성 RAMA37 세포주에 Osteopontin의 expression vector를 이입시킨 후 이를

Furth-Wistar rat의 유선 지방세포에 접종시켰을 때, 실험군 55% 에서 폐전을 보였으며²⁴, osteopontin 재조합 cDNA 플라스미드를 murine neuroblastoma C1300 세포주에 이입시켰을 때, 신생혈관을 보이기도 하였다²⁵. 또한 loss of function 연구로서 Wu등²⁶은 Osteopontin 결손 마우스가 ras 형질전환 이후에도 느린 종양성장을 보임을 관찰하였고, B16 흑색종 세포주를 Osteopontin 결손 마우스에 주입하였을 때, 폐전이감소함이 관찰되었다²⁷. 또한 antisense를 이용한 Osteopontin 발현 억제에 의하여 MDA-MB-231 유방암세포의 골전이 감소가 관찰되기도 하였다²⁸. Koh등⁸의 연구에서 osteopontin 유전자는 전이암에서 원발암보다 과발현되는 것으로 관찰되었으며, 따라서 osteopontin 유전자 산물이 전이암에서 원발암과 다르게 발현될 것으로 추정되며, 이를 대장암 진행 혹은 전이의 표지자로 검증하는 것은 의의 있는 일로 사료된다.

본 연구에서 Osteopontin의 조직에서의 표현이 원발성 대장암보다 전이성 대장암에서 높게 나타난 것은 주목할 만하다. 그러나, 제한된례수에서 Osteopontin 발현의 변화와 환자의 생존률과의 관계를 규명하지 못하였고, 특히 종양 절제 후 재발로 발생한 전이종양의 발생과의 관계를 규명하는데 한계를 나타내었다. 종양 절제 후 재발한 적절한 규모의 전이종양 환자군을 대상으로 Osteopontin이 원발 종양 절제 후 추적관찰에 사용할 수 있을지를 규명하는 것은 의의가 있을 것이다. 한편,

Osteopontin이 분비성 단백질이라는 점에서, 조직에서의 발현이 혈중 Osteopontin 수준으로 반영이 되는지의 여부 역시 밝혀지지 않았으므로, 대상 환자군의 혈청 Osteopontin 수준을 enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) 등의 방법으로 측정하여 정량하는 것은 Osteopontin이 대장암에서 예후 추정을 위한 혈청 생물학적 표지자로 사용할 수 있을지를 판별함에 필수적인 단계일 것이다.

현재까지는 Osteopontin의 발현이 정상조직-선종-원발선암-전이종양의 순서로 증가하는 것으로 알려져 있는데¹¹, 이러한 증가가 Osteopontin이 tumor burden을 반영하여 나타난 현상인지, 전이 관련 특정 물리 화학적 변화를 반영하는 것인지 불투명하므로, Osteopontin의 생화학 및 생물학적 메커니즘을 이해하는 것은 필수적이라 하겠다. Osteopontin은 대장암에서 널리 알려져 있는 Wnt pathway의 표적 유전자로 알려진 바 있으며²⁹, 종양 억제 유전자 adenomatous polyposis coli (APC) gene의 돌연변이가 osteopontin 유전자의 과발현과 관련있다는 보고가 있으므로³⁰ 현재까지 알려진 Osteopontin의 발현 양상이 소위 APC pathway가 아닌 현미부수체 불안정성 대장암 환자군에서도 유사하게 나타나는지 관찰하는 것 역시 흥미로운 연구가 될 것이다.

Matrix metalloprotease (MMP)는 세포외 기질의 분해를 통하여 암세포의 전이에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다³¹. 이들이 종양 전이에

관여하는 기전으로 신생혈관생성, 침습, 전이장기에 전이점(metastatic foci)을 생성하는 것 등이 알려졌다³². MMP-1, -2, -3, -7, -9, -13, -14 등에서 종양 혹은 전이암에서의 발현은 종양의 나쁜 분화도, 침습도, 나쁜 예후 및 생존율 감소와 연관 있다고 알려져 있다³². 예외적으로, MMP-8의 발현이 전이형질을 획득한 사람 유방암 세포에서 감소하는 것이 관찰되었으나, 일반적으로는 MMP의 발현 혹은 활성은 췌장암, 대장암, 유방암, 자궁경부암 및 흑색종 등에서 병의 진행과 상관관계를 보이는 것으로 알려져 있다³². MMP의 조직 내 발현과 함께, 혈중 MMP 농도가 또한 병의 진행도를 알 수 있는 인자라는 연구 역시 이루어지고 있는데, 혈중의 soluble gelatinase, 특히 MMP-9과 MMP-1이 흑색종에서 전이빈도의 증가와 상관관계가 있는 것을 보여, 중요한 예후인자라는 보고가 있다³³. MMP-1 발현은 대장암의 나쁜 예후와 관련 있다고 알려져 있으며, MMP-1 특이 억제제 사용 시 대장암 유발 누드 마우스의 종양유발이 억제되었다³⁴. 또한 식도암과 유방암에서 MMP-1 발현은 나쁜 예후와 관련 있다고 알려져 있다³⁵.

³⁶. Koh 등⁸의 연구에서 MMP-1은 전이종양에서 원발종양보다 낮은 발현 양상을 나타냈으며, 현재까지 알려진 MMP-1 발현과 전이행태의 상관관계를 고려할 때, 이의 조직 혹은 혈청에서의 발현양상을 대규모의 대장암 환자에서 연구하는 것은 의의가 있을 것이다. 본 연구에서 MMP-1 발현은, 원발종양 보다 전이종양에서는 감소된 것으로 나타났다. 현재까지 알려져

있는 연구의 결과에 따르면 MMP-1의 과발현이 종양의 침습과 성장율을 증가시키는 것으로 알려져 있으므로, MMP-1의 과발현이 비교적 종양 성장 초기에 이루어졌다가 turn off 될 가능성이 존재한다.

Serpin 은 분비형 당단백으로 간에서 생성되어 여러 장기, 특히 폐에서 단백질분해효소를 억제하는 기능을 하는 것으로 알려져 있다. 생물학적으로 폐에서의 $\alpha 1$ -antitrypsin으로 알려져 있는 Serpin A1의 기능은 말초 호흡기계의 백혈구에서 분비되는 elastase를 분해하여, 폐 손상을 막는 것으로 알려져 있다. 정상적으로 혈장 혹은 혈청 Serpin A1의 농도는 1,200-2,000mg/L이나, 여러 가지 염증성질환, 감염, 종양, 간질환 및 임신 등에서 증가하는 것이 관찰되었다³⁷. 많은 연구를 통하여 Serpin A1 유전적 결핍자에서 간암과 방광암의 발생이 통계적으로 유의하게 증가하는 것으로 알려져 있다³⁸. 또한, 고빈도 현미부수체 불안정성 관련 대장암 환자의 경우 Serpin A1 유전자 결핍의 빈도가 저빈도 현미부수체 불안정성 혹은 현미부수체 안정성 대장암에 비하여 높다는 보고가 있다 (21.6% vs 9.1%). Scamuffa et al.은 합성 $\alpha 1$ - antitrypsin 중 하나인 $\alpha 1$ -antitrypsin Portland의 과발현이 사람 대장종양세포주의 전이 잠재능을 억제하는 것을 보였다³⁹. 이러한 연구와는 상반되게, Serpin A1이 종양의 악성도, 혹은 종양 진단의 생물학적 표지자가 될 수 있다는 연구 역시 진행되고 있다. 최근, 악성 인슐린종의 표지자로서 Serpin A1가

제시된 바 있으며⁴⁰, ALK(anaplastic large cell lymphoma kinase) 양성 역형성 대 세포 림프종의 림프절외 침습과 Serpin A1의 발현이 연관되어 있다는 보고도 있다⁴¹. 또한 프로테오믹 연구를 통하여 Serpin A1이 폐암⁴²과 대장암⁹의 진단적 표지자로서 제시되기도 하였다.

Koh등⁸의 연구에서 Serpin A1은 전이성 종양에서 원발성 종양보다 up-regulation된 것으로 나타났으며⁸, 각종 암에서 혈중 농도를 통하여 암발생 표지자로 연구되는 점은 Serpin A1의 악성종양의 진행과 침습, 전이에서의 역할 규명이 필요함을 시사한다.

본 연구에서 Serpin A1(α 1-antitrypsin)의 발현이 전이 종양에서 높게 나타나지 않은 점은, 앞서 언급한 바와 같은 원인들의 분석, 즉, 분비성 단백질인 점에서 조직 내 Serpin A1의 수준이 실제 종양조직에서의 생성 정도를 반영할 수 있는가의 검증이 필요할 것으로 생각된다. 실험적으로는, 우선 혈청으로 분비되는 Serpin A1의 정도를 검색하는 것 역시 추후에 진행되어야 할 것이다.

종합적으로 본 연구에서는 Osteopontin과 MMP-1이 원발 종양과 전이 종양에서 차이를 보였으며 이의 병태생리학적 의미를 연구하는 것이 필요할 것으로 생각된다.

V. 결론

최근 oligonucleotide microarray를 이용하여 원발성 대장암과 전이 대장암 조직 사이에 약 80여개의 다르게 발현되는 유전자가 분석되었으며, 이들의 생물학적 기능은 기존에 알려진 종양의 전이관련 행태와 관련 있을 것으로 추정되었다. 본 연구에서는 이 들 중 Osteopontin, MMP-1, serpin A1의 발현을 43세트의 validation set을 대상으로 면역조직화학염색을 이용하여 이전의 microarray data 결과를 검증하고자 하였다. Osteopontin 이 전이암 조직에서 원발암에 비하여 높은 발현을 보였으며, Osteopontin 발현 증가가 있는 집단에서 생존율이 낮은 경향을 보였으나, 통계적으로 유의하지는 않았다. MMP-1의 경우 전이암 조직에서 원발암에 비하여 낮은 발현을 보였으며, Serpin A1의 경우 원발암과 전이암 간 발현의 차이가 없었다. 그러나 Osteopontin과 MMP-1의 발현의 차이는 혈관침습과 림프절 전이여부, 환자의 생존율과 유의한 관계를 보이지 않았다. Osteopontin이 분비성 단백임을 고려할 때, 혈중 Osteopontin 발현의 검색을 통하여 종양표지자로 적절성을 평가하는 것은 의미 있을 것으로 사료된다.

참고문헌

1. Kumar V, Abbas AK, Fausto N, Robbins SL, Cotran RS. Robbins and Cotran pathologic basis of disease. 7th ed. Philadelphia: Elsevier/Saunders; 2005.
2. Sunami E, Tsuno N, Osada T, Saito S, Kitayama J, Tomozawa S, et al. MMP-1 is a prognostic marker for hematogenous metastasis of colorectal cancer. *Oncologist* 2000;5:108-14.
3. Ramaswamy S, Ross KN, Lander ES, Golub TR. A molecular signature of metastasis in primary solid tumors. *Nature genetics* 2003;33:49-54.
4. van 't Veer LJ, Dai H, van de Vijver MJ, He YD, Hart AA, Mao M, et al. Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. *Nature* 2002;415:530-6.
5. Bertucci F, Finetti P, Cervera N, Maraninchi D, Viens P, Birnbaum D. Gene expression profiling and clinical outcome in breast cancer. *Omics* 2006;10:429-43.
6. Bertucci F, Houlgatte R, Nguyen C, Viens P, Jordan BR, Birnbaum D. Gene expression profiling of cancer by use of DNA arrays: how far from the clinic? *The lancet oncology* 2001;2:674-82.
7. Bertucci F, Salas S, Eysteris S, Nasser V, Finetti P, Ginestier C, et al. Gene expression profiling of colon cancer by DNA microarrays and correlation with histoclinical parameters. *Oncogene* 2004;23:1377-91.
8. Koh K, et al. Gene Expression Profiles of Paired Primary and Metastatic Colorectal Carcinomas, manuscript in press. *Oncologist* 2008.
9. Ward DG, Suggett N, Cheng Y, Wei W, Johnson H, Billingham LJ, et al. Identification of serum biomarkers for colon cancer by proteomic analysis. *Br J Cancer* 2006;94:1898-905.
10. Locker GY, Hamilton S, Harris J, Jessup JM, Kemeny N, Macdonald JS, et al. ASCO 2006 update of recommendations for the use of tumor markers in gastrointestinal cancer. *J Clin Oncol* 2006;24:5313-27.

11. Wai PY, Kuo PC. Osteopontin: regulation in tumor metastasis. *Cancer Metastasis Rev* 2008;27:103-18.
12. Senger DR, Perruzzi CA, Papadopoulos-Sergiou A, Van de Water L. Adhesive properties of osteopontin: regulation by a naturally occurring thrombin-cleavage in close proximity to the GRGDS cell-binding domain. *Mol Biol Cell* 1994;5:565-74.
13. Tuck AB, Arsenault DM, O'Malley FP, Hota C, Ling MC, Wilson SM, et al. Osteopontin induces increased invasiveness and plasminogen activator expression of human mammary epithelial cells. *Oncogene* 1999;18:4237-46.
14. Tuck AB, O'Malley FP, Singhal H, Harris JF, Tonkin KS, Kerkvliet N, et al. Osteopontin expression in a group of lymph node negative breast cancer patients. *Int J Cancer* 1998;79:502-8.
15. Tuck AB, O'Malley FP, Singhal H, Tonkin KS, Harris JF, Bautista D, et al. Osteopontin and p53 expression are associated with tumor progression in a case of synchronous, bilateral, invasive mammary carcinomas. *Arch Pathol Lab Med* 1997;121:578-84.
16. Ue T, Yokozaki H, Kitadai Y, Yamamoto S, Yasui W, Ishikawa T, et al. Co-expression of osteopontin and CD44v9 in gastric cancer. *Int J Cancer* 1998;79:127-32.
17. Shijubo N, Uede T, Kon S, Maeda M, Segawa T, Imada A, et al. Vascular endothelial growth factor and osteopontin in stage I lung adenocarcinoma. *Am J Respir Crit Care Med* 1999;160:1269-73.
18. Chambers AF, Wilson SM, Kerkvliet N, O'Malley FP, Harris JF, Casson AG. Osteopontin expression in lung cancer. *Lung Cancer* 1996;15:311-23.
19. Thalmann GN, Sikes RA, Devoll RE, Kiefer JA, Markwalder R, Klima I, et al. Osteopontin: possible role in prostate cancer progression. *Clin Cancer Res* 1999;5:2271-7.
20. Pan HW, Ou YH, Peng SY, Liu SH, Lai PL, Lee PH, et al. Overexpression of

osteopontin is associated with intrahepatic metastasis, early recurrence, and poorer prognosis of surgically resected hepatocellular carcinoma. *Cancer* 2003;98:119-27.

21. Agrawal D, Chen T, Irby R, Quackenbush J, Chambers AF, Szabo M, et al. Osteopontin identified as lead marker of colon cancer progression, using pooled sample expression profiling. *J Natl Cancer Inst* 2002;94:513-21.
22. Tuck AB, Elliott BE, Hota C, Tremblay E, Chambers AF. Osteopontin-induced, integrin-dependent migration of human mammary epithelial cells involves activation of the hepatocyte growth factor receptor (Met). *J Cell Biochem* 2000;78:465-75.
23. T. Yoneda PJWaMN. Promotion of angiogenesis and enhancement of breast cancer metastasis to bone. *Bone* 1998;23:201.
24. Oates AJ, Barraclough R, Rudland PS. The identification of osteopontin as a metastasis-related gene product in a rodent mammary tumour model. *Oncogene* 1996;13:97-104.
25. Takahashi F, Akutagawa S, Fukumoto H, Tsukiyama S, Ohe Y, Takahashi K, et al. Osteopontin induces angiogenesis of murine neuroblastoma cells in mice. *Int J Cancer* 2002;98:707-12.
26. Wu Y, Denhardt DT, Rittling SR. Osteopontin is required for full expression of the transformed phenotype by the ras oncogene. *Br J Cancer* 2000;83:156-63.
27. Nemoto H, Rittling SR, Yoshitake H, Furuya K, Amagasa T, Tsuji K, et al. Osteopontin deficiency reduces experimental tumor cell metastasis to bone and soft tissues. *J Bone Miner Res* 2001;16:652-9.
28. Adwan H, Bauerle TJ, Berger MR. Downregulation of osteopontin and bone sialoprotein II is related to reduced colony formation and metastasis formation of MDA-MB-231 human breast cancer cells. *Cancer Gene Ther* 2004;11:109-20.

29. El-Tanani MK, Barraclough R, Wilkinson MC, Rudland PS. Regulatory region of metastasis-inducing DNA is the binding site for T cell factor-4. *Oncogene* 2001;20:1793-7.
30. Rohde F, Rimkus C, Friederichs J, Rosenberg R, Marthen C, Doll D, et al. Expression of osteopontin, a target gene of de-regulated Wnt signaling, predicts survival in colon cancer. *Int J Cancer* 2007;121:1717-23.
31. Aznavoorian S, Murphy AN, Stetler-Stevenson WG, Liotta LA. Molecular aspects of tumor cell invasion and metastasis. *Cancer* 1993;71:1368-83.
32. Deryugina EI, Quigley JP. Matrix metalloproteinases and tumor metastasis. *Cancer Metastasis Rev* 2006;25:9-34.
33. Nikkola J, Vihinen P, Vuoristo MS, Kellokumpu-Lehtinen P, Kahari VM, Pyrhonen S. High serum levels of matrix metalloproteinase-9 and matrix metalloproteinase-1 are associated with rapid progression in patients with metastatic melanoma. *Clin Cancer Res* 2005;11:5158-66.
34. Murray GI, Duncan ME, O'Neil P, Melvin WT, Fothergill JE. Matrix metalloproteinase-1 is associated with poor prognosis in colorectal cancer. *Nat Med* 1996;2:461-2.
35. Murray GI, Duncan ME, O'Neil P, McKay JA, Melvin WT, Fothergill JE. Matrix metalloproteinase-1 is associated with poor prognosis in oesophageal cancer. *J Pathol* 1998;185:256-61.
36. Remacle AG, Noel A, Duggan C, McDermott E, O'Higgins N, Foidart JM, et al. Assay of matrix metalloproteinases types 1, 2, 3 and 9 in breast cancer. *Br J Cancer* 1998;77:926-31.
37. Crystal RG. The alpha 1-antitrypsin gene and its deficiency states. *Trends Genet* 1989;5:411-7.
38. Sun Z, Yang P. Role of imbalance between neutrophil elastase and alpha 1-antitrypsin in cancer development and progression. *The lancet oncology* 2004;5:182-90.

39. Scamuffa N, Siegfried G, Bontemps Y, Ma L, Basak A, Cherel G, et al. Selective inhibition of proprotein convertases represses the metastatic potential of human colorectal tumor cells. *The Journal of clinical investigation* 2008;118:352-63.
40. de Sa SV, Correa-Giannella ML, Machado MC, Krogh K, de Almeida MQ, Albergaria Pereira MA, et al. Serpin peptidase inhibitor clade A member 1 as a potential marker for malignancy in insulinomas. *Clin Cancer Res* 2007;13:5322-30.
41. Duplantier MM, Lamant L, Sabourdy F, de Reynies A, Delsol G, Espinos E. Serpin A1 is overexpressed in ALK+ anaplastic large cell lymphoma and its expression correlates with extranodal dissemination. *Leukemia* 2006;20:1848-54.
42. Patz EF, Jr., Campa MJ, Gottlin EB, Kusmartseva I, Guan XR, Herndon JE, 2nd. Panel of serum biomarkers for the diagnosis of lung cancer. *J Clin Oncol* 2007;25:5578-83.

Abstract

Title: Different expression of metastasis-related genes in primary and metastatic colorectal carcinomas

Metastasis is one of the most important characteristics of cancer in terms of its impact on the prognosis such as patient survival. However, understanding of the cellular and molecular mechanism of metastasis is still limited due to intrinsic complexity of mechanism governing whole process. Using high-throughput microarray using 19K spotted human oligonucleotides, gene expression of primary and matched metastatic colon cancer was compared in previous study. Although it did not demonstrate complete classification of primary and metastatic carcinoma, 80 differentially expressed genes have been identified. Among these, expression of Osteopontin, MMP-1 and serpin A1 have been assessed in 43 paired validation set of tissue microarray using immunohistochemistry. The expression of Osteopontin is significantly higher in metastatic carcinoma than primary carcinoma, as mRNA expression is. The expression of MMP-1 is significantly lower in metastatic carcinoma than primary. However, expression of serpin A1 is not correlated with the result from microarray. Thus, the expression of Osteopontin and MMP-1 successfully classify primary and metastatic colorectal carcinoma in the validation set and further studies on their clinical application should be followed accordingly.

Key words: primary colorectal carcinoma, metastatic colorectal carcinoma, oligonucleotide microarray, immunohistochemistry staining, osteopontin, MMP-1