유방암에서 혈중 간세포 성장인자 (HGF) 측정의 임상적 유용성 평가

연세대학교 대학원

의 학 과

성현주

유방암에서 혈중 간세포 성장인자 (HGF) 측정의 임상적 유용성 평가

지도 송 경 순 교수

이 논문을 석사학위논문으로 제출함

2002년 6월 일

연세대학교 대학원

의 학 과

성 현 주

성현주의 석사학위논문을 인준함

심사위원 _____ 인

심사위원 _____ 인

심사위원 _____ 인

연세대학교 대학원

2002년 6월 일

감사의 글

논문이 완성되기까지 부족한 저에게 많은 격려와 세심한 지도를 하여 주신 송경순 교수님, 이 논문에 대해 변함없는 관심을 보이시고 자문을 아끼지 않으신 오기근 교수님과 이희대 교수님께 깊은 감사 드립니다. 논문의 완성까지 여러모로 배려하여 주신 김정호 부교수님, 많은 도움을 주신 임상병리과 혈액학계, 면역혈청계 직원 및 의국원들에게도 깊이 감사 드립니다.

논문의 완성까지 옆에서 항상 힘이 되어 준 남편, 부모님 그리고 별이에게 사랑과 감사의 마음을 전합니다.

저 자 씀

차 례

표 차례

그림 차례

국문요약

유방암에서 혈중 간세포 성장인자(HGF) 측정의 임상적 유용성 평가

간세포 성장인자(HGF)는 상피세포의 증식과 이동을 조절하는 사이토카인의 일종으로 다양한 종양에서 그 발현이 증가되며 진행된 breast cancer에서도 혈중 HGF의 농도가 흔히 증가되어 있는 것으로 알려져 있다. 본 연구에서는 원발성 및 재발성 유방암 환자를 대상으로 혈중 HGF 농도를 측정하고 유방암의 다른 예후 인자들과의 상관성을 평가하여, 혈중 HGF 측정의 임상적 유용성을 평가하고자 하였다.

총 72명의 유방암 환자의 혈액을 채취하여 혈장내 HGF의 농도를 효소면역법 (Quantikine human HGF colorimetric sandwich ELISA kit, R&D, Minneapolis, MN, USA)으로

측정하였다. 또한 건강한 대조군 55명을 선정, 혈중 HGF 농도를 검사하여 평균 ± 표준편차의 기준으로 연령에 따른 정상 참고치를 구하였다. 혈중 HGF의 정상 참고치는 평균(±표준편차), 426(±120) pg/mL로 연령에 비례하여 증가하였다. 유방암 환자의 혈중 HGF 농도는 연령대별 대조군에 비해 유의한 수준의 증가를 보였다. 또한 재발성 유방암 환자군에서 원발성 환자군에 비해 유의한 혈중 HGF의 증가가 있었다. 원발성 유방암 환자에서의 혈중 HGF 농도의 증가와 종양의 크기, 림프절 전이, Her-2/neu over-expression, DNA aneuploidy, 조직학적 grade등과 같은 기존의 예후 인자와의 상관성 비교 연구에서는 상호 유의한 수준의 상관성이 없었다.

유방암에서 혈중 HGF가 증가됨을 알 수 있었고 원발성에 비해 재발성 유방암에서 더욱 증가되므로 종양의 재발을 조기

발견할 수 있는 유용한 검사로 사용될 수 있을 것으로 생각된다. 기존의 다른 유방암 예후 인자와의 상관성 여부는 추후 더 많은 환자군을 대상으로 전향적 연구가 필요할 것으로 사료된다.

핵심되는 말: 간세포 성장인자(HGF), ELISA, 원발성 유방암, 재발성 유방암, 예후 인자

유방암에서 혈중 간세포 성장인자 (HGF) 측정의 임상적 유용성 평가

<지도교수 송경순>

연세대학교 대학원 의학과

성 현 주

I. 서론

간세포 성장인자 (hepatocyte growth factor, HGF)는 scatter factor라는 이름으로도 알려져 있으며, 이는 여러 다양한 정상세포와 종양세포에서 분열, 운동, 형태발생, 혈관형성을 유발하는 사이토카인의 일종이다[1,2]. 유방암에서 HGF는 다양한 기능을 통해 종양의 진행에 영향을 주는데, 여러

in vitro 연구 결과, HGF가 focal adhesion kinase와 paxillin의 phosphorylation을 유도하여 종양세포의 세포외 기질로의 부착, 침습, 이동을 촉진시키는 것으로 밝혀졌다[3]. 이러한 HGF의 작용은 c-MET라는 intrinsic kinase domain을 가진 proto-oncogene을 매개로 하여 발현된다[4].

유방암 조직은 풍부한 간질세포(stromal cell)를 포함하고 있으며 이 중 섬유아세포(fibroblast)가 HGF를 생산하는 주요 장소인 것으로 밝혀졌고, 정상 조직에 비해 유방암 조직의 stromal fibroblast에서 더욱 많은 양의 활성화된 형태의 HGF가 발현되고 있다. 최근 유방암 환자에서 종양내 HGF의 발현정도는 의미 있는 예후 지표의 하나로 보고된 바 있다[5,6].

외국의 경우, 유방암 환자의 혈중 HGF 농도가 증가된 경우들도 많은데 특히 원격 전이가 있는 환자군에서 더욱 증가되어 있다고 보고되었다[7,8]. 그러나 아직 국내에서는 이에

관한 연구가 많지 않은 실정이다.

최근 혈장 검체에서 비교적 간단하고 신속하게, 조직검사에 비해 덜 침습적으로 HGF를 측정할 수 있는 ELISA검사가 개발된 바 있다. 이에 본 연구는 유방암 환자에서 혈중 농도를 측정한 후 대조군과 비교하여 보았다. 또한 이미 유방암의 중요한 예후 인자로 평가되어 임상에서 널리 사용되고 있는 종양의 크기, 림프절 전이, HER-2/neu over-expression, DNA ploidy, 조직학적 grade등과 HGF의 혈중 HGF 농도간의 유의한 상관성 유무를 조사함으로써 ELISA법을 이용한 HGF의 측정이 유방암 환자에서 다른 예후 지표들과 함께 임상적으로 유용하게 사용될 수 있을지 여부를 평가하고자 하였다.

II. 재료 및 방법

1. 연구 대상

연구대상은 2001년 7월부터 2002년 4월까지 영동세브란스병원 및 세브란스병원에 내원하여 조직 검사상 breast carcinoma로 진단 받고 유방 절제술과 림프절 절제술을 시행 받은 원발성 유방암 환자 60명과 재발성 유방암 환자 14명을 대상으로 연구를 진행하였다. 상기 대상자 중 B형 또는 C형 간염 등으로 인해 간기능에 이상이 있는 환자들은 제외하였다. 원발성 유방암 환자군을 T stage에 따라 분류하면 carcinoma in situ 8명, T1 27명, T2 17명, T3 5명이었고, 재발성 유방암 환자군은 T1 2명, T2 5명, T3 1명, T4 3명, 진단시 T stage를 알 수 없는 환자 3명이었으며, 평균 추적 관찰 기간은 6.3 $\pm$ 4 년 이었다. 대조군으로 환자군과 연령

분포를 맞춘 53명의 건강한 여성을 선정하였다. 즉, 영동세브란스병원 건강검진 센터를 내원한 여성중 과거력과 일반혈액검사, 간기능검사, 간염 바이러스 검사상 이상소견이 없는 여성을 대상으로 하였다. 혈장 HGF의 참고치는 건강한 대조군을 연령대별 분류하여 평균±표준편차로 설정 하였다. 재발성 유방암 환자군 14명 중 8명은 다발성 장기 재발 환자였으며 그 중 6명은 간을 포함한 다발성 장기 재발이었다. 간, 폐 등의 타 장기 전이는 computed tomography scan으로 진단하였고 골전이는 X-ray검사와 bone scintigraphy로 진단하였다.

2. 실험 방법

가. 검체 채취와 보관

HGF 농도 측정을 위한 채혈은 Vacutainer system

(Becton-Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA)을 사용하여 상완의 정맥에서 채취하였고, 채혈용기는 EDTA anticoagulant tube를 사용하였다. 채혈된 검체는 혈장을 분리하여 검사 시행일 까지 -70°C에서 보관하였다.

나. 검사 시약과 검사방법

HGF의 측정은 Quantikine human HGF colorimetric sandwich ELISA kit (R&D, Minneapolis, MN, USA)를 사용하여 검사하였다. 이 검사법은 quantitative sandwich enzyme immunoassay technique으로 microplate에 pre-coating된 monoclonal antibody에 혈장내 존재하는 HGF를 결합시킨 후 enzyme처리된 HGF에 대한 특이 polyclonal antibody를 결합시켜 450nm의 흡광도에서 발색반응을 통해 정량검사를 하는 방법이며 40 pg/mL-4000 pg/mL의 직선성 범위를 가진다.

다. 통계적 분석

연령별, 대상군별 분석은 Kruskal-Wallis ANOVA와 paired t-test를 이용하였고 임상적, 병리적 지표와의 상관관계는 t-test, oneway ANOVA, Mann-Whitney test를 이용하여 분석하였다. $p<0.05$를 통계적 유의수준으로 채택하였다.

III. 결과

1. 정상 대조군의 혈중 간세포 (HGF) 농도 참고치

정상 대조군 53명에서 측정한 혈중 HGF 농도의 평균 $\pm$ 표준편차는 426 $\pm$ 120 pg/mL 이었다. 정상 대조군에서 혈장 HGF 농도는 연령과 비례하여 증가하는 양상을 보였다 ($p<0.05$). 연령별 HGF의 정상 참고치는 평균값$\pm$표준편차로

정하였다 (표 1).

표 1. 혈중 HGF 농도의 연령에 따르는 정상 참고치

연령(세)	대조군 수	참고치(pg/mL)
20-29	7	347 ± 88
30-39	15	375 ± 81
40-49	14	399 ± 99
50-59	10	474 ± 109
60-69	7	597 ± 92
전체	53	426 ± 120

Note * 평균 ± 표준편차

2. 유방암 환자군의 혈중 HGF 농도 분포

71명의 유방암 환자에서 혈중 HGF 농도의 평균 ± 표준편차는 784 ± 847 pg/mL 이었다. 혈중 HGF 농도를 연령대별 대조군의 농도와 비교한 결과, 20대에서 60대 까지 모든 연령대에서 환자군이 정상 대조군에 비해 HGF 농도의 증가를 보였다. (그림 1).

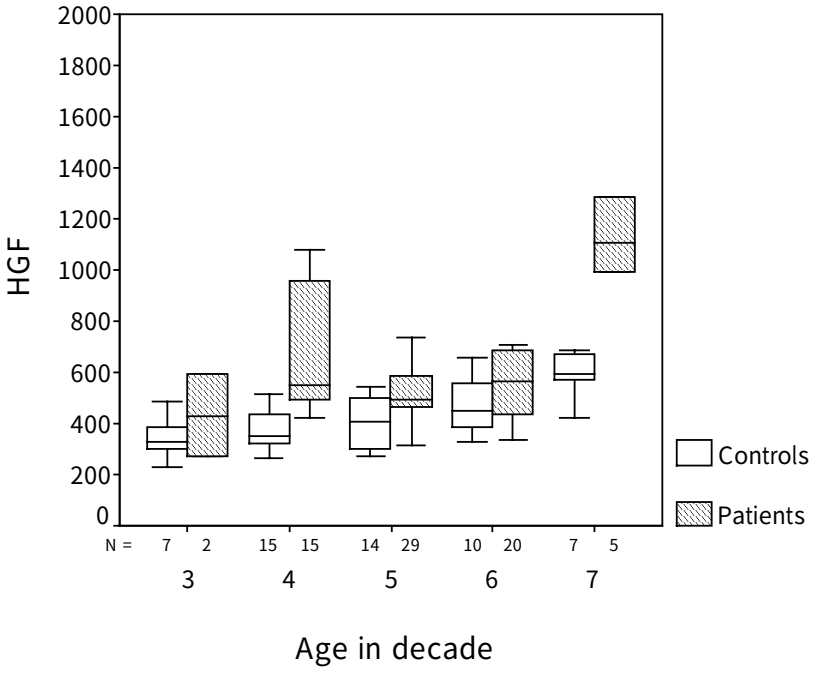


그림 1. 유방암 환자군과 정상 대조군에서 연령별 혈중 HGF 농도 비교

3. 원발성 유방암 환자군과 재발성 유방암 환자군의 HGF 농도 비교

원발성 유방암 환자군과 재발성 유방암 환자군의 비교 결과, 재발된 환자군에서 HGF 농도가 유의하게 증가하였으며, 같은

연령대별로 t-test를 시행한 결과 유의한 차이를 보였다 ($p<0.05$)(그림 2). 또한 비모수적 검정법의 하나인 Mann-Whitney test를 시행하여 T-stage별로 원발성 유방암과 재발성 유방암 환자군에서 HGF농도가 유의한 차이가 있는지 비교해 보았다. T2 stage에서 두 환자군에서 유의한 차이가 있는 것으로 나타났다 ($p=0.02$) (그림 3).

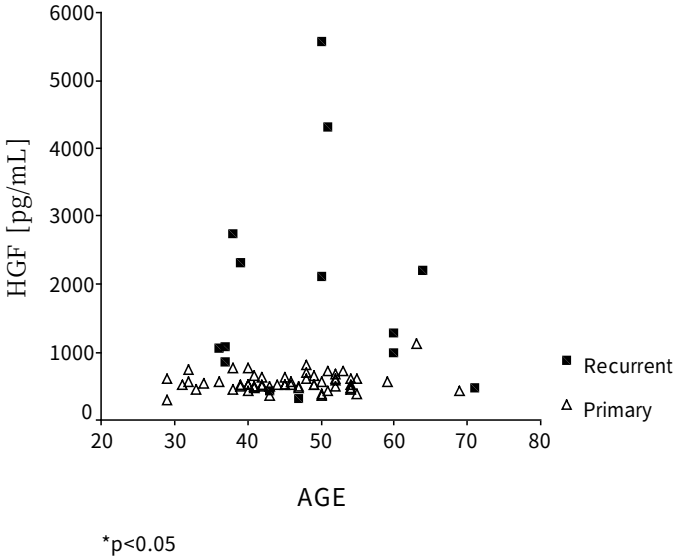


그림 2. 원발성 유방암 환자군과 재발성 유방암 환자군에서 혈중 HGF 농도 비교

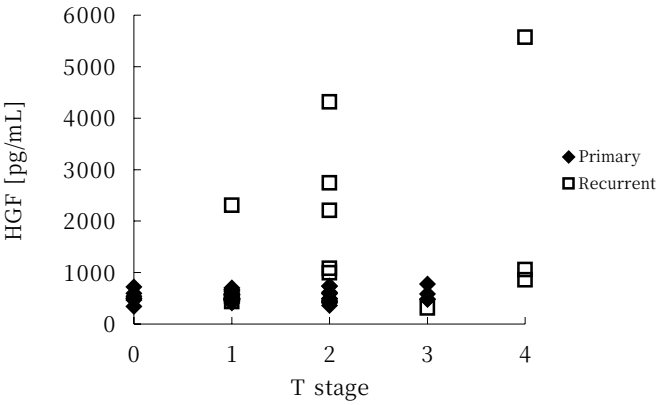


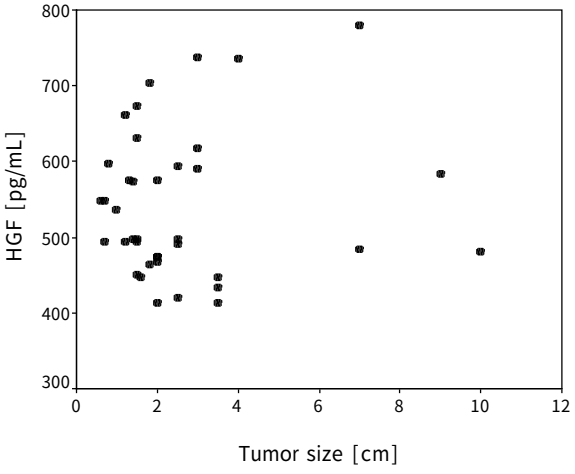
그림 3. 원발성 유방암 환자군과 재발성 유방암 환자군에서

병기에 따른 혈중 HGF 농도 비교

4. 유방암의 예후 인자들과 혈장 HGF 농도의 상관성

원발성 유방암 환자군에서 혈장 HGF 농도는 종양의 크기, 전이 림프절 수, Her 2/neu over-expression, DNA aneuploidy, 조직학적 grade와는 유의한 수준의 상관 관계가 없는 것으로 나타났다. 종양의 크기와 HGF 농도의 상관성을 Pearson correlation, 그 외의 다른 인자들과 농도와의 상관성은 t-test를 시행한 결과 모두 유의한 상관관계를 보이지 않았다 (종양의 크기, p=0.58; LN involvement, p= 0.71; Her 2/neu over-expression, p=0.88; DNA index, p=0.27; 조직학적 grade

p=0.12) (그림 4,5).



*p=0.58

그림 4. 종양의 크기와 혈중 HGF 농도의 상관성

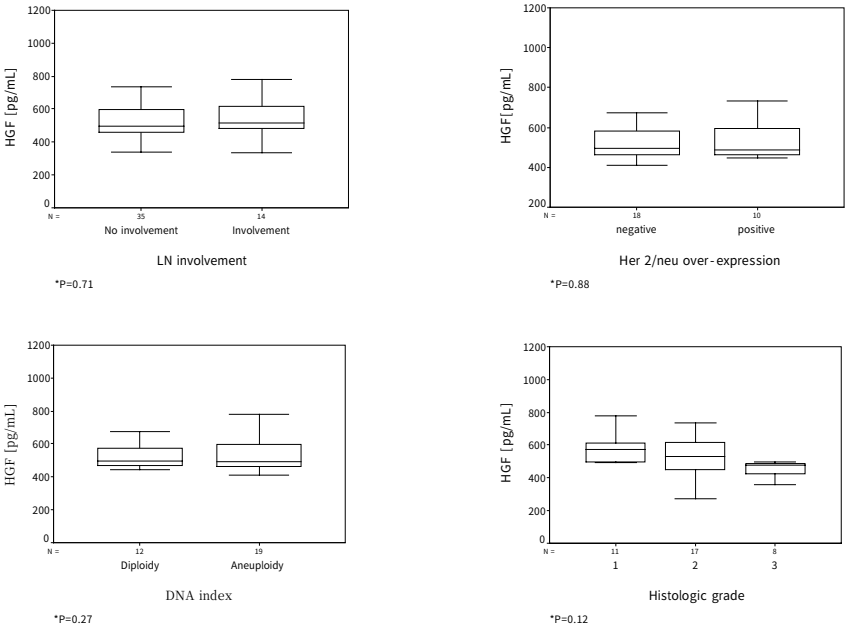


그림 5. 유방암의 예후 인자들과 혈중 HGF 농도의 상관성

IV. 고찰

여러 다양한 정상세포와 종양세포에서 세포의 분열, 운동, 형태발생, 혈관형성을 유발하는 사이토카인의 일종인 간세포 성장인자(HGF)는 최근 유방암을 비롯한 각종 종양, 동맥경화증 등 다양한 질환과 상관성이 보고되고 있다[7-9].

본 연구에서 정상 대조군의 혈중 HGF 참고치는 평균(±표준편차) 426(±120) pg/mL이었고, 연령별로 20대 347(±88) pg/mL, 30대 375(±81) pg/mL, 40대 399(±99) pg/mL, 50대 474(±109) pg/mL, 60대 597(±92) pg/mL 의 값을 보여 연령이 증가함에 따라 혈중 농도가 증가함을 알 수 있었다. 최근 혈중 HGF와 carotid arterial remodeling에 관한 연구에서 연령의 증가(>65세)와 혈중 HGF농도의 증가가 유의한 상관 관계가 있다고 발표한 바 있다[7]. 이와 상반되게 Toi 등은 205명의 건강한 성인 남녀를 대상으로 혈중 HGF 농도를 구한 결과 남녀 모

두 20대에 최고치 (393±246 pg/mL, 평균±표준편차)를 보였고 점차 연령이 증가함에 따라 유의하게 감소하였다고 보고하였다[9].

위와 같은 상반된 결과에 대하여는 앞으로 검사 방법의 표준화 및 더 많은 대상군에 대한 연구가 뒤따라야 할 것으로 생각된다.

본 연구 결과상 유방암 환자군에서 정상 대조군에 비해 혈중 HGF의 농도가 유의하게 증가되어 있었던 것은 유방암을 비롯한 여러 종양에서 HGF가 carcinogenesis에 관여한다는 기존의 연구들과 일치하는 결과라 할 수 있다[10-15]. Genichiro 등은 2001년에 발표한 논문에서 유방암 조직 중 특히 cancer front에서 증가되어 있는 HGF/c-Met co-expression이 종양의 성장에 영향을 준다는 연구결과를 보고한 바 있다[2]. 또한 Toi 등은 200명의 원발성 유방암 환자를 대상으로 시행한 연구결과 혈중 HGF의 농도가 연령별 정상 대조군에 비해 27%에서 증가되어

있었으며, 이렇게 HGF가 증가된 환자군이 증가되지 않은 군에 비해 예후가 불량한 것으로 나타났다고 하였다[9].

유방암 환자에서 유방암 조직 뿐만 아니라 혈중에도 HGF가 증가하는 것에 관하여, 몇 종류의 protease, 예를 들어 plasminogen activator, heparitinase 등이 HGF의 활성화에 관여하는 것으로 알려졌는데, 이들이 extracellular matrix bound form 이나 전구물질 형태의 HGF를 활성화 시키고 혈중으로 방출시킬 수 있는 것으로 밝혀졌다[16].

연구 결과 임상적으로 재발이 있는 환자군에서 혈중 HGF의 농도가 현격한 증가를 보였다. 위의 재발성 유방암 환자 14명 중 11명이 원격 장기에 재발 소견이 있었다. HGF는 종양의 원격 전이를 up-regulation시키는데 관여한다고 알려져 있다. 아직 혈중 내 HGF 농도가 어떤 작용기전으로 up-regulation되는지는 명확히 밝혀진 바는 없으나, 종양조직이 제거되면 증가되었

던 혈중 HGF 농도가 급격히 떨어지며, 또한 효과적인 항암 치료 시행 후에도 혈중 HGF 농도가 감소함이 보고되었다[17].

본 연구에서 원발성 유방암 환자군에서의 혈중 HGF 농도의 증가는 종양의 크기, 림프절 전이, Her 2/neu over-expression, DNA aneuploidy등과 같은 기존에 잘 알려져 있는 유방암 예후 인자들과 상관관계를 갖지 않았다. 그러나 Toi 등은 혈중 HGF 농도가 종양의 크기, 림프절 전이,종양의 혈관 침습등과 같은 기존의 유방암 예후 인자들과 높은 상관성을 갖는다고 보고한 바 있다[9]. 이것은 본 연구 대상의 대부분 환자들이 초기 유방암 환자들이었던 점과 총 연구 대상 환자 수가 충분치 못했던 때문일 것으로 생각된다. 아직 한국인을 대상으로 충분히 연구된 바가 없으므로 추후 추가적인 보완연구를 통해 검토 할 만한 가치가 있다고 사료된다. 비록 적은 수의 환자에서의 비교였으나 같은 T2 stage의 환자라 할지라도 원발성 유방암 환자들

과 비교하여 재발성 유방암 환자들에서 HGF의 농도가 유의한 증가를 보인 것은 앞으로 혈중 HGF 농도의 측정이 유방암 재발의 한 표지자로서 임상적으로 사용될 수 있는 가능성을 시사한다고 생각한다.

결론적으로 혈중 HGF농도의 농도는 유방암 환자군에서 정상 대조군보다 유의한 증가를 보였고 특히 재발성 유방암 환자에서 원발성 환자에 비해 유의한 증가가 있었다. 따라서 유방암 환자에서 혈장 HGF를 측정하고 추적 관찰하는 것은 종양의 원격전이와 재발을 조기 진단을 하는데 있어 유용할 것으로 판단된다.

V. 결론

원발성 유방암 환자들과 재발성 유방암 환자들에서 혈장 HGF

농도를 측정하고 유방암의 다른 예후 인자들과의 상관성을 평가하여, 혈중 HGF ELISA 측정법이 임상적으로 유용하게 사용될 수 있을지 평가하고자 총 71명의 유방암 환자와 53명의 정상 대조군에서 HGF의 측정을 시행하였다. 유방암 환자의 혈중 HGF 농도는 연령대별 정상 대조군에 비해 유의한 증가를 보였다. 또한 재발성 유방암 환자군에서 원발성 환자군에 비해 유의한 혈중 HGF의 증가가 있었다. 원발성 유방암 환자에서 혈중 HGF 농도의 증가와 종양의 크기, 림프절 전이, 종양세포의 Her-2/neu over-expression, DNA aneuploidy, 조직학적 grade등과 같은 기존의 예후 인자와의 상관성 비교 연구에서는 상호 유의한 수준의 상관성이 없었다.

결론적으로 유방암에서 혈중 HGF가 증가됨을 알 수 있었고 원발성에 비해 재발성 유방암에서 더욱 증가되므로 종양의 재발을 조기 발견 할 수 있는 유용한 검사로 사용될 수 있을

것으로 생각된다. 기존의 다른 유방암 예후 인자와의 상관성 여부는 추후 더 많은 환자군을 대상으로 전향적 연구가 필요할 것으로 사료된다.

참고문헌

1. Brinkmann V, Foroutan H, Sachs M, Weidner KM, Birchmeier W. Hepatocyte growth factor/scatter factor induces a variety of tissue - specific morphogenic programs in epithelial cells. J Cell Biol 1995; 131: 1573 –86.
2. Genichiro E, Eizaburo S, Toshimi S, Osamu T, Kohji M. Expression of the hepatocyte growth factor/c - Met pathway is increased at the cancer front in breast carcinoma. Pathol Int 2001; 51: 172 - 8.
3. Jiang WG, Hiscox S, Matsumoto K, Nakamura T. Hepatocyte growth factor/scatter factor, its molecular and cellular and clinical implications in

cancer. Crit Rev Oncol /Hematol, 1999; 29: 209 - 48.

4. Bottaro DP, Rubin JS, Faletto DL, Chan L, Kmiecik TE, Vandewoude GF, et al. Identification of the hepatocyte growth factor as the c - met protooncogene product. Science 1991; 258: 802 - 4.
5. Jin L, Fuchs A, Schnitt SJ. Expression of scatter factor and c - met receptor in benign and malignant breast tissue. Cancer 1997; 79: 749 – 60.
6. Yamashita J, Ogawa M, Yamashita S, Nomura K, Kuramoto M, Saishoji T, et al. Immunoreactive hepatocyte growth factor is a strong and independent predictor of recurrence and survival in human breast cancer. Cancer Res 1994; 54: 1630 - 3.
7. Yamamoto Y, Kohara K, Tabara Y, Miki T.

Association between arterial remodeling and plasma concentration of circulating hepatocyte growth factor. J Hypertens 2001; 9: 1975 - 9.

8. Taniguchi T, Kitamura M, Arai K, Iwasaki Y, Yamamoto Y, Igari A, et al. Increase in the circulating level of hepatocyte growth factor in gastric patients. Br J Cancer 1997; 75: 673 - 7.
9. Toi M, Taniguchi T, Ueno T, Asano M, Funata N, Sekiguchi K, et al. Significance of circulating hepatocyte growth factor level as a prognostic indicator in primary breast cancer. Clin Cancer Res 1998; 4: 659 - 64.
10. Jeffers M, Rong S, Anver M, Woude GFV. Autocrine hepatocyte growth factor/scatter factor - met

signaling induces transformation and the invasive/metastatic phenotype in C127 cells. Oncogene 1996; 13: 853 - 61.

11. Kuniyasu H, Yasui Y, Yokozaki H, Kitadai Y, Tahara E. Aberrant increase of c - met mRNA in human gastric carcinomas. Int J Cancer 1993; 55: 72 - 5.
12. Furukawa T, Duguid WP, Kobari M, Matsuno S, Tsao MS. Hepatocyte growth factor and met receptor expression in human pancreatic carcinogenesis. Am J Pathol 1995; 147: 889 - 95.
13. Joseph A, Weiss GH, Jin L, Fuchs A, Chowdhury S, O'Shaugnessy P, et al. Expression of scatter factor in human bladder carcinoma. J Natl Cancer Inst 1995; 87: 372 - 7.

14. Tuck AB, Park M, Sterns EE, Boag A, Elliott BE. Coexpression of hepatocyte growth factor and receptor(met) in human breast carcinoma. Am J Pathol 1996; 148: 225 - 32.
15. Seslar S, Nakamura T, Byer SW. Regulation of fibroblast hepatocyte growth factor/scatter factor expression by human breast carcinoma cell lines and peptide growth factors. Cancer Res 1993; 53: 1233 - 8.
16. Mars WM, Zarnegar R, Michalopoulos GK. Activation of hepatocyte growth factor by the plasminogen activators uPA and tPA. Am J Pathol 1993; 143: 949 - 58.
17. Taniguchi, T, Toi M, Inada K, Imazawa T, Yamamoto

Y, Tominaga T. Serum concentrations of hepatocyte growth factor in breast cancer patients. Clin Cancer Res 1995; 1: 1031 - 4.

Abstract

Clinical usefulness of circulating hepatocyte growth factor (HGF) in breast cancer

Hyun - Ju Sung

Department of Medicine

The Graduate School, Yonsei University

(Directed by Professor Kyung - Soon Song)

Hepatocyte growth factor (HGF) is a cytokine modulating epithelial cell proliferation and motility. Circulating HGF level is frequently increased in a variety of tumors, including advanced breast cancer. The clinical usefulness of

measuring circulating HGF in breast cancer patients was evaluated in this study.

The plasma HGF levels in both primary and recurred breast cancer patients (n=71) were measured by ELISA method using Quantikine human HGF colorimetric sandwich ELISA kit(R&D, Minneapolis, MN, USA), and the results were compared with those of age matched healthy controls (n=53). The mean (±SD) plasma levels of HGF were also compared between primary and recurrent breast cancer patients.

The correlation of circulating HGF level and conventional prognostic factors of breast cancer such as tumor size, lymph node involvement, Her-2/neu over-expression, DNA aneuploidy was studied to further evaluate the clinical

usefulness of HGF as a new prognostic indicator in breast cancer.

The mean (±SD) plasma HGF levels were increased in breast cancer patients (784 ± 847 pg/mL), compared with those of age matched healthy control women (426 ± 120 pg/mL) ($p<0.05$). Patients with recurrent breast cancer (1839 ± 1535 pg/mL) showed increased HGF levels compared with primary breast cancer (592 ± 132 pg/mL) ($p<0.05$).

No significant correlations between plasma HGF levels and conventional prognostic indicators of breast cancer including tumor size, lymph node involvement, Her-2/neu over-expression, DNA aneuploidy, and histologic grade were found.

The above findings may suggest that the measurement of plasma HGF level in breast cancer patients may be useful for early detection of metastasis or recurrence.

Key Words: hepatocyte growth factor (HGF), ELISA, primary breast cancer, recurrent breast cancer, prognostic indicator