

자궁경부암의 Cyclooxygenase-2
과발현이 갖는 임상적 의의

연세대학교 대학원

의 학 과

김 용 배

자궁경부암의 Cyclooxygenase-2
과발현이 갖는 임상적 의의

연세대학교 대학원

의 학 과

김 용 배

자궁경부암의 Cyclooxygenase-2
과발현이 갖는 임상적 의의

지도교수 김 귀 언

이 논문을 석사학위 논문으로 제출함

2002 년 12 월 일

연세대학교 대학원
의 학 과
김 용 배

김용배의 석사 학위논문을 인준함

심사위원 _____ 인

심사위원 _____ 인

심사위원 _____ 인

연세대학교 대학원

2002 년 12 월 일

감사의 글

항상 부족한 저에게 가르침을 주시고 본 논문이 완성되도록 지도와 배려를 해 주신 김귀언 원장님께 진심으로 감사드립니다. 또한 연구 시작부터 논문 작성까지 세심한 지도를 해 주신 조남훈 교수님과 김영태 교수님께도 감사의 말씀을 올립니다.

바쁜 전공의 생활에서도 연구를 수행할 수 있게 격려해주신 서창욱 교수님, 성진실 교수님, 이창걸 교수님, 금기창 교수님, 표홍렬 교수님, 추성실 교수님께 감사드립니다. 진료에 여념이 없는 후배 의국원들과 방사선종양학과 식구 여러분께도 고마움을 전하고 싶습니다.

사랑하는 부모님, 늘 격려해주시는 장인, 장모님, 항상 곁에서 힘이 되어주는 사랑하는 아내와 딸 은서에게 이 논문을 바칩니다.

저 자 씬

차 례

그림 차례	ii
표 차례	iii
국문 요약	iv
I. 서론	1
II. 재료 및 방법	5
1. 환자 및 치료 프로토콜	5
2. 조직 배열 블록	6
3. 면역조직화학염색	6
4. 통계분석	7
III. 결과	8
1. 면역조직화학염색 소견	8
2. 임상적 특성	8
3. 치료 실패 양상	9
4. 생존율 및 예후인자	12
IV. 고찰	16
V. 결론	19
참고 문헌	20
영문 요약	25

그림 차례

Figure 1. Cyclooxygenase-1 (COX-1) and COX-2 are important enzymes in prostaglandin biosynthesis.	2
Figure 2. Representative immunohistochemical features are shown in photomicrographs from patients with carcinoma of the uterine cervix. Cyclooxygenase-1 (COX-1) showed a negative staining (a). COX-2 staining was observed in neoplastic epithelial cells (b). COX-2 was stained along the front margin of tumor invasion (c). COX-2 showed cytoplasmic immunoreactivity (d).	9
Figure 3. Diagrams showing the difference in the failure patterns between patients in the cyclooxygenase-2 (COX-2) positive group and patients in the COX-2 negative group.	11
Figure 4. Temporal relationship of the cumulative incidence of failure patterns between the cyclooxygenase-2 (COX-2) positive patients and the COX-2 negative patients (Kaplan-Meier method).	12
Figure 5. Comparison of the overall actuarial survival and disease-free survival rates in patients according to their cyclooxygenase-2 (COX-2) expression level (Kaplan-Meier method). Patients in the COX-2 positive group (n = 21 patients; solid lines) had a poorer prognosis compared with patients in the COX-2 negative group (n = 54 patients; dotted lines).	13

표 차 례

Table 1. Comparison of cyclooxygenase-1 (COX-1) and COX-2	3
Table 2. Clinical profiles	10
Table 3. Univariate analysis of the prognostic factors	14
Table 4. Multivariate analysis of the prognostic factors	15

국문요약

자궁경부암의 Cyclooxygenase-2 과발현이 갖는 임상적 의의

Cyclooxygenase-2 (COX-2)는 프로스타글란딘(prostaglandin)의 합성을 촉매 하는 효소로서 자궁경부암을 포함한 각종 암에서 과발현이 관찰되고 있고 암의 형성과정 뿐만 아니라 침윤 및 전이에 있어서도 매우 중요한 역할을 하고 있음이 밝혀져 있다. 본 연구에서는 1991년부터 1996년까지 연세암센터 방사선종양학과에서 자궁경부암 FIGO (the International Federation of Gynecology and Obstetrics) II B 병기 편평세포암으로 진단 받고 동시 항암 화학방사선요법이 시행된 75명의 환자를 대상으로 COX-2 과발현의 예후 인자로서의 가능성을 규명하고자 하였다. 진단 당시의 생검 조직으로 COX-2 면역조직화학염색을 시행하였고 모든 환자를 COX-2 음성군과 COX-2 양성군의 두 군으로 구분하였다. 두 군간에는 환자의 연령, 전신수행상태, 조직학적 유형, 종양의 크기 등에 통계적으로 유의한 차이가 없었고 치료방법도 동일하였다. 두 군의 동시 항암화학방사선요법은 5-fluorouracil와 platinum 병용요법(중양횟수: 3회)을 사용하였고 방사선 치료는 75 Gy부터 102 Gy (중양선량: 84 Gy) 까지 시행되었다. COX-2 발현유무에 따른 치료 실패 양상, 전체생존율, 무병생존율을 후향적으로 비교 분석한 결과는 다음과 같다.

1. 면역조직화학염색은 총 75예 중 21예(28%)에서 COX-2 양성반응이 관찰되었다.
2. COX-2 양성군의 중심 실패율(central failure rate)과 림프절 실패율(nodal failure rate)은 COX-2 음성군보다 통계적으로 유의하게 더 높았다. 그러나 혈행성 전이율은 두 군간에 차이가 없었다.
3. COX-2 양성군은 조기에 재발되는 양상을 나타냈다(중양재발시기; COX-2

양성군: 9개월, COX-2 음성군: 26개월).

4. COX-2 양성군의 5년 전체생존율 및 무병생존율은 COX-2 음성군보다 유의하게 낮았다(5년 전체생존율; COX-2 양성군: 94% 대 COX-2 음성군: 56%, log-rank test, $p= 0.003$).
5. COX-2의 과발현은 단일변량분석 및 다변량분석결과 독립적인 예후 인자로 나타났다.

이상의 결과로부터 동시 항암화학방사선요법을 시행한 자궁경부 FIGO II B기 편평세포암에서 COX-2의 발현은 예후에 영향을 주는 분자 위험 요소 (molecular risk factor)임이 규명되었고 그러므로 COX-2 양성인 환자에서 COX-2 억제제의 임상적 응용을 위한 가능성을 제시할 수 있었다.

핵심되는말 : cyclooxygenase-2, 자궁경부암, 편평세포암, 동시 항암화학방사선요법, 예후인자

자궁경부암의 Cyclooxygenase-2

과발현이 갖는 임상적 의의

<지도교수 김 귀 언>

연세대학교 대학원 의학과

김 용 배

I. 서론

자궁경부암은 골반강 내에 국한되고 골반 림프절, 복대동맥 림프절, 쇄골 윗림프절로 순차적으로 전이하는 경향을 나타내며 표준의 치료법에 비교적 잘 반응하는 편이지만,¹ 생물학적으로 공격적(aggressive)이거나 치료에 잘 반응하지 않는 경우도 있어서 때로는 임상양상을 예측하기 어려운 경우도 있다. 일반적으로 자궁경부암의 예후는 FIGO (the International Federation of Gynecology and Obstetrics) 병기, 종양의 크기, 림프절 전이 유무나 치료방법 등 기존에 잘 알려진 고위험요소들과 밀접한 상관관계가 있으나 공격성을 보이는 자궁경부암에선 이러한 임상적 변수와 무관한 경우도 없지 않다.² 사실상 치료의 성공 여부는 예후의 정확한 평가에 따라 좌우될 수 있으므로 개개의 환자에서 임상양상을 보다 적절히 예측하기 위해서는 추가적인 표적(target)이 될 수 있는 분자 물질에 관한 연구가 필요하다. 자궁경부암을 포함한 여러 종류의 악성 종양에서 지난 십여년간 제시된 새로운 생물학적 표지자 들 중 최근 cyclooxygenase (COX)가 중요한 예후 인자의 하나로 주목받고 있다.

COX-2는 아라키돈산(arachidonic acid)에서 프로스타글란딘(prostaglandin)이나 다른 eicosanoid들의 합성을 촉매 하는 효소로 알려져 있다(그림 1). COX 효소에는 성격이 서로 다른 두 가지의 동종이 있는데 COX-1은 대부분의 진핵 세포에서

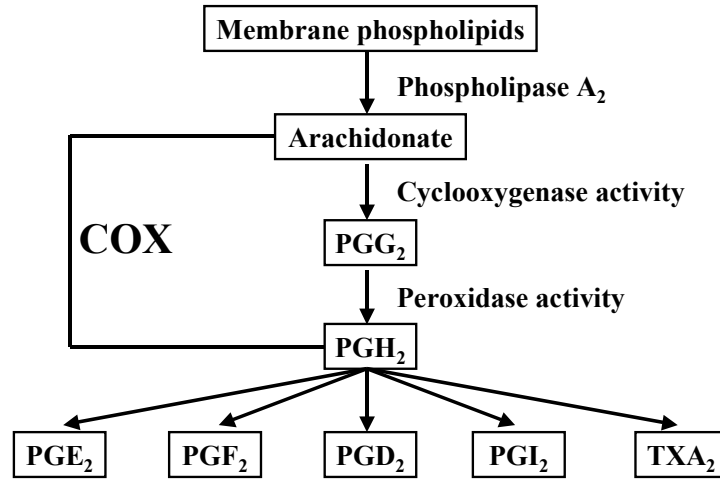


Figure 1. Cyclooxygenase-1 (COX-1) and COX-2 are important enzymes in prostaglandin biosynthesis. COX, cyclooxygenase. PG, prostaglandin. TX, thromboxane.

구조적으로(constitutively) 발현되고 정상 생리기능을 위한 프로스타글란딘의 합성에 관여하는 반면 COX-2는 tumor promoter, 사이토카인 및 성장요소(growth factor) 등을 포함한 다양한 자극에 반응하여 급성기에 유도된다.³⁻⁵ COX-1과 COX-2의 유전학적 비교는 표 1과 같다. 많은 연구들에 의해 COX-2는 특히 실험 쥐나 인간의 악성종양 모델에서 증가하는 것이 밝혀져있고, 세포분열, 세포유착(adhesion)과 면역 기전(immune surveillance)에 영향을 주는 병리 작용을 매개함으로써 암생성(carcinogenesis), 증식(proliferation), 성장(growth)과 전이(spread)를 증진시키는 것이 확인되고있다.^{3-7,9} 또한 COX-2 과발현(overexpression)은 아포토시스(apoptosis)를 억제하고 종양혈관형성(tumor angiogenesis)을 촉진하며,^{4,5,10-14} 동시에 COX-2가 증가되면 신경교종, 폐암, 유방암, 식도암, 위암, 특히 결장직장암 등 여러 종류의 암에서 중요한 예후인자로 이용할 수 있음이 보고되고 있다.¹⁵⁻²²

Table 1. Comparison of cyclooxygenase-1 (COX-1) and COX-2

Feature	COX-1	COX-2
Expression	Constitutive	Inducible
Gene size	22 kb	8.3 kb
Human chromosome	9	1
mRNA size	2.7 kb	4.5 kb: contains multiple AU-rich elements
Localization	Endoplasmic reticulum, nuclear envelope	Endoplasmic reticulum, nuclear envelope
Cell and tissue expression	expressed in most cells or tissues	expressed in most cells or tissues after stimulation with cytokines (eg. TNF α ¹ , interleukin 1 β), growth factors (eg. EGF ²), or tumour promoters (eg. bile acids)

¹TNF α , tumour necrosis factor. ²EGF, epidermal growth factor.

그러나 자궁경부암에서 COX-2 과발현이 예후에 어떠한 영향을 미치는지에 대해 아직까지 광범위한 연구가 이루어지지 않고 있다. 지금까지 COX-2 과발현을 보인 자궁경부암 환자가 나타내는 공격적인 임상 양상이나 불량한 예후에 대해서는 단지 두 편의 임상 연구만이 있으며 이 연구들도 수술이나 방사선치료를 받은 자궁경부암 환자 중 COX-2 과발현을 보이는 일단(cohort)이 불량한 예후를 나타내는 것으로 보고하고 있다.^{23,24} 그러나 두 연구 모두 비교적 소수의 환자만을 대상으로 하였을 뿐 아니라 그 중 한 연구는 여러 FIGO 병기를 나타내는 불균일한 환자 군을 포함하고 있어서 정확한 결론을 유도하기에는 어느 정도 제한점이 있었다. 특히 FIGO 병기 II B기의 치료는 방사선요법이 표준 치료 방법으로 간주되

어 왔지만 최근 몇 편의 무작위 임상 연구에서 불량한 예후 인자를 가진 환자를
동시 항암화학방사선요법으로 치료 받은 환자들에서 유의하게 생존율이 향상되었
다는 보고가 있다.^{25,26} 그러나 지금까지도 동시 항암화학방사선요법을 시행된 환자
들에 있어 COX-2 과발현이 예후에 미치는 영향에 대해서는 아직까지 연구된 바
없다. 따라서 본 연구에서는 동시 항암화학방사선요법을 시행된 자궁경부 FIGO
병기 IIb기 편평세포암 환자에서 COX-2 과발현을 보인 환자의 치료 실패 양상을
살펴보고 예후에 미치는 영향을 분석하고자 하였다.

II. 재료 및 방법

1. 환자 및 치료 프로토콜(Patients and treatment protocol)

연세대학교 의과대학 연세암센터 방사선종양학과에서 1991년부터 1996년까지 자궁경부암 FIGO 병기 II B기 편평세포암으로 동시 항암화학방사선요법이 시행된 75명의 환자를 본 연구의 대상으로 하였다. 자궁경부암의 임상병기와 조직학적 분류는 FIGO 병기와 세계보건기구 분류(World Health Organization, Geneva, Switzerland)를 따랐고 모든 환자에 대해 치료 전 복부골반 전산화단층촬영이나 자기공명영상을 시행하였다. 환자군의 균일성을 높이기 위해 소세포암(small cell carcinoma)과 선암(adenocarcinoma) 환자는 제외하였다. 또한 방사선요법 단독이나 전보조화학요법(neoadjuvant chemotherapy) 후 방사선요법이 시행된 환자도 제외하였다. 동시 항암화학방사선요법은 복부골반 전산화단층촬영이나 자기공명영상에서 종양 직경이 4 cm 이상이거나 림프절 전이 등의 고 위험요소를 가진 환자에게 시행되었다. 치료 프로토콜의 상세 내용은 이전 논문에서 기술한 바 있다.²⁷ 요약하자면 방사선요법 시행과 동시에 첫째 주, 넷째 주, 일곱째 주에 세 차례에 걸쳐 항암화학요법을 시행하였고 화학요법 약제는 cisplatin과 5-fluorouracil (5-FU)으로 구성되었다. cisplatin은 5일동안 매일 100 mg/m²의 해당량을 일시주사(bolus)하며, 5-FU는 1000 mg/m²의 해당량을 24시간 지속성 정맥 정주(24-hour continuous infusion)로 투여하였다. 방사선치료는 외부 방사선조사과 Ir-192 (Gamma-Med II)를 사용한 고 선량 강내 조사(high dose-rate intracavitary radiation)를 병용하였다. 외부 골반 조사는 분획(fraction) 당 1.8 Gy로 주당 5회로 하여 중심선량(midline dose)이 27 Gy 또는 36 Gy까지 시행하였다. 이어서 point A에 분획 당 5 Gy씩 총 30 Gy까지 6회(주당 2 회)의 고 선량 강내 조사를 한 후 중심차폐를 하고 총 선량이 45~50.4 Gy가 되도록 2차로 외부 방사선조사를 실시하였다. 치료 종료 후 모든 환자를 최소 5년 간 3개월마다 추적관찰 하였다.

2. 조직 배열 블록(Tissue array block)

수여 블록(recipient block)은 $3.8 \times 2.2 \times 0.5 \text{ cm}^3$ 의 틀에 정제된 우무(agar)로 만들어졌다. 블록 위에 중심 침(core needle)으로 2 mm 크기의 구멍을 만들었고, 우무를 제거하였다. 공여 블록(donor block)은 헤마톡실린-에오신염색 슬라이드(hematoxylin-eosin stain slide)를 확인하여 준비하였다. 공여 블록에서 종양세포가 있는 부위를 찾아 2 mm 중심침으로 수여 블록에 심었다. 기존의 파라핀 블록에 사용하는 틀을 이용하여 수여 블록의 주형을 만들고, 파라핀을 첨가하였다. 유리판에 2 mm 간격으로 배열될 수 있도록 성분간 결합을 유지해주는 adhesive coated slide system (Instrumedics Inc., Hackensack, New Jersey, USA)를 이용하여 수여 블록을 4 μm 두께의 절편으로 잘라냈다.

3. 면역조직화학염색(Immunohistochemistry)

포르말린으로 고정된 파라핀 조직블록으로부터 잘라낸 4 μm 두께의 절편에 대해 자이렌(xylene)으로 파라핀을 제거하고(dewax) 여러 농도의 에탄올 용액을 거쳐 재수화(rehydrate)하였다. 5분 동안 인산완충용액(phosphate buffered saline)으로 씻어내고 내인성 과산화효소(endogenous peroxidase)의 발현을 막기 위해 30분 동안 메탄올 0.3% 과산화수소용액에 보관하였다. 항원복구(antigen retrieval)를 위해 절편은 95°C에 30분 동안 pH 6.0의 0.01 mol/L 시트르산나트륨 완충 용액(sodium citrate-buffered saline)에서 마이크로파로 처리하였다. 슬라이드는 5분간 인산완충용액으로 씻어내고 10분간 상온에서 10% rabbit serum용액으로 처리하여 비특이성 반응을 차단하였다. 그리고, COX-1, COX-2 일차항체(Cayman, Ann Arbor, MI, USA)는 각각 1:800, 1:1,500으로 희석하여 4 °C에서 밤새 반응하도록 하였다. 각 항체는 10분간 마이크로파를 이용한 masked epitope의 unmasking effect를 근거로 시트르산 완충액(pH 6.0)에 담가 예열하였다. 비특이성 mouse IgG1 단 클론성 항체(03001 D, Pharmingen, 1mg/ml)를 음성 대조군으로 사용하였다. 절편을 이차 항체인 biotinylated horse anti-mouse antibody (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA)를 1:500으로 희석하여 반응시키고 세척한 후 1:25로 희석시킨 avidin-biotin peroxidase complex에 반응하도록 하였다.

Diaminobenzene (DAB)으로 발색하고, 헤마톡실린으로 핵 대조염색을 시행하였다. 세포질 면역반응은 무 염색(0%)에서부터 미만성이며 균일하고 강한 반응을 보이는 염색(100%)까지의 연속선상에서 분류하여 반응이 50% 이상일 때 양성군으로 분류하였다. 검사자간의 오류를 배제하기 위하여 환자의 임상 결과를 모르는 병리 의사가 결과를 판정하였다.

4. 통계분석(Statistical analysis)

두 군간의 임상적 특징과 치료 실패율의 차이는 카이제곱검정(chi-square test)으로 비교하였다. 전체생존율과 무병생존율은 Kaplan-Meier method을 이용하였고 log-rank test로 두 군을 비교하였다. 생존율에 영향을 주는 예후 인자를 찾기 위해 단일변량분석을 실시하였다. 예후 인자로 추정되는 여러 변수들간의 중요도를 결정하기 위해 Cox Regression Analysis로 다변량분석을 실시하였다. p 값은 0.05 미만을 통계적으로 의미가 있는 것으로 해석하였다.

Ⅲ. 결 과

1. 면역조직화학염색 소견(Immunohistochemical findings)

COX-1, COX-2 발현 양상은 종양내에서 세기와 분포면에서 모두 약양성부터 명확한 강양성까지 불균일하게 발현되는 것으로 확인되었다. COX-1의 반응은 주위 정상세포에 분포되었으나 COX-2는 모두 암종세포에만 국소적이거나 미만성 반응을 나타냈다. COX-1 면역양성반응은 정상 상피세포(normal epithelial cell)와 간질세포(stromal cell)에서 모두 나타났고 간간히 섬유아세포(fibroblast), 혈관 내피세포(vascular endothelial cell)와 혈관 평활근 세포(vascular smooth cell)에서도 나타났다. 대조적으로 COX-2 면역 양성반응은 상피세포에서 나타났으나 간질세포에서는 거의 나타나지 않았다. COX-2 면역 양성반응 양상은 어떤 암종 세포에서는 핵 주위에서 양성 반응을 나타내기도 했으나 대부분 세포질에서 산재하는 양성 반응을 보여주었다(그림 2). 염색의 세기와 분포는 상호 연관성을 보였으나, 분포에 따라 분류를 시행하였다. 분포가 50%이상일 경우 양성으로 판정하였다. 이에 따른 COX-1, COX-2의 전체 양성도는 33%, 28%였다. 그러나 각각의 환자에서 COX-1와 COX-2의 발현 정도는 상관 관계가 없었다.

2. 임상적 특성(Clinical profiles)

모든 환자를 COX-2 발현 정도에 따라 COX-2 음성군(54명)과 COX-2 양성군(21명)으로 분류하였다. COX-1 과발현은 예후로서 중요성이 떨어져 분석에서 제외시켰다. COX-2 음성군과 COX-2 양성군의 임상적 특성은 표 2에서 제시하였다. COX-2 발현과 임상 변수사이의 상관조사결과 COX-2 발현과 연령, 수행정도, 조직병리학적 아형(subtype), 종양의 모양, 종양의 크기 및 자궁결조직(parametrium)의 침범여부 등은 상관관계가 없었다. COX-2 양성군에서 골반림프절 전이의 빈도가 높은 것으로 나타났지만 통계적으로 의미는 없었다.

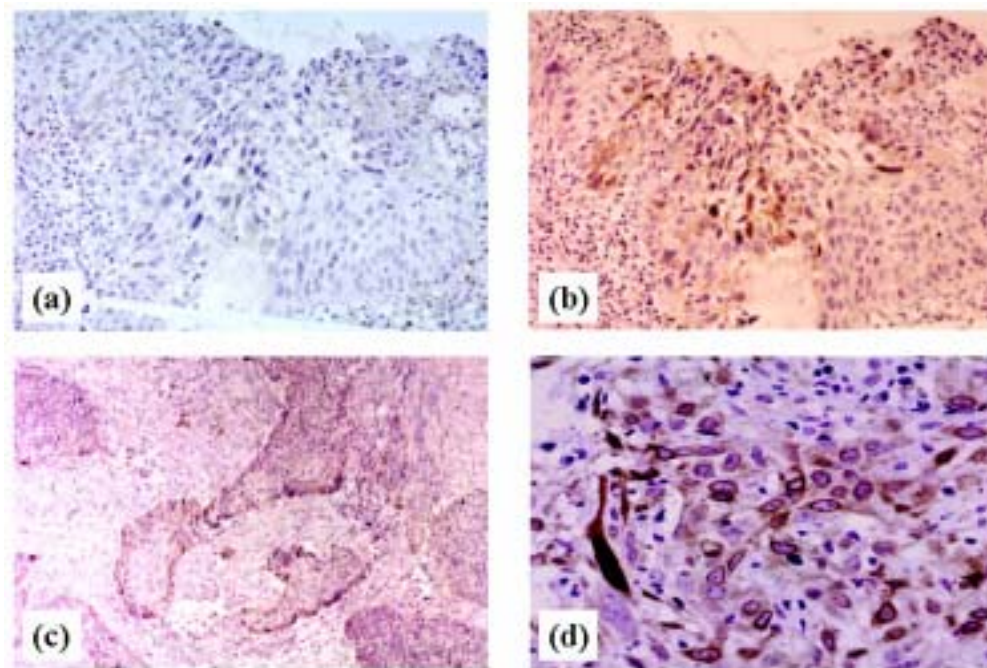


Figure 2. Representative immunohistochemical features are shown in photomicrographs from patients with carcinoma of the uterine cervix. Cyclooxygenase-1 (COX-1) showed a negative staining (a). COX-2 staining was observed in neoplastic epithelial cells (b). COX-2 was stained along the front margin of tumor invasion (c). COX-2 showed cytoplasmic immunoreactivity (d).

3. 치료 실패 양상(Patterns of treatment failure)

치료에 두 군의 반응은 대체적으로 양호하였으나, COX-2 음성군에 비하여 COX-2 양성군에서 치료 후 종양의 감소(regression)가 지연되는 경향을 나타냈다. 분석 당시까지 전체 환자 중 총 20명의 환자에서 재발이 확인되었다. COX-2 음성군 중 11명(20%), COX-2 양성군 중 9명(43%)에서 재발이 확인되었다. COX-2 양성군의 치료 실패율은 COX-2 음성군보다 통계적으로 유의하게 높았다($p < 0.05$).

Table 2. Clinical profiles

Characteristic	No. of patients (%)		Statistical significance
	COX-2 negative	COX-2 positive	
No. of patients	54	21	
Age (years)			
Median	57	52	NS ⁸
Range	29 - 75	32 - 67	
Karnofsky performance status			
Median	80	80	NS
Range	60 - 90	60 - 90	
Pathology			
LCK ¹	14 (26%)	6 (28%)	NS
LCNK ²	40 (74%)	15 (72%)	
Tumor Shape			
Exophytic	11 (20%)	8 (38%)	NS
Infiltrative	43 (80%)	13 (62%)	
Tumor Size (cm)			
< 6	40 (74%)	15 (71%)	NS
≥ 6	14 (26%)	6 (29%)	
Extent of Parametrial Extension			
Unilateral/Medial ³	23 (43%)	8 (38%)	NS
Bilateral/Lateral ⁴	31 (57%)	13 (62%)	
Pelvic LN ⁵ Involvement	7 (13%)	6 (29%)	NS
CT ⁶ Cycle (median)	3	3	NS
RT ⁷ Dose (Gy)			
Median	84	84	NS
Range	75 - 94	75 - 102	

¹LCK, large cell keratinizing. ²LCNK, large cell nonkeratinizing. ³unilateral and medial-half extension. ⁴bilateral or lateral-half extension. ⁵LN, lymph node. ⁶CT, chemotherapy. ⁷RT, Radiotherapy. ⁸NS, not significant.

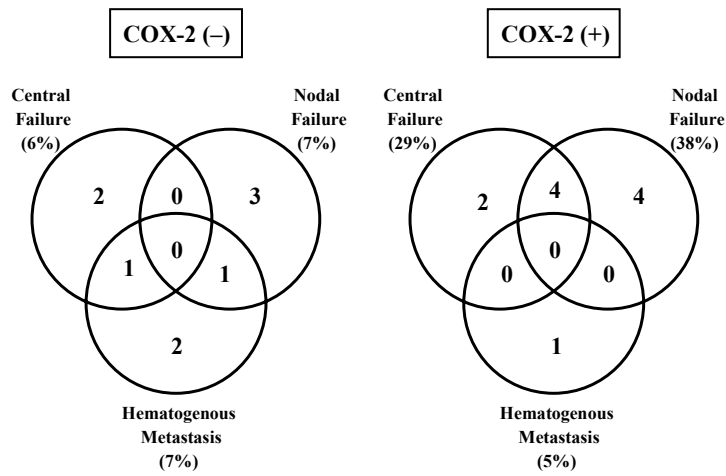


Figure 3. Diagrams showing the difference in the failure patterns between patients in the cyclooxygenase-2 (COX-2) positive group and patients in the COX-2 negative group.

두 군에서의 치료 실패 양상을 그림 3에 제시하였다. COX-2 음성군의 중심 실패 (central failure)는 3예, 림프절 실패(nodal failure)는 4예, 혈행성 전이는 4예였으나 COX-2 양성군은 중심 실패는 6예, 림프절 실패는 8예, 혈행성 전이는 1예였다. 치료에 의한 완전관해(complete remission)를 얻었음에도 불구하고, COX-2 양성군의 중심 실패율이 COX-2 음성군보다 월등히 높았다(COX-2 양성군; 29%, COX-2 음성군; 6%, $p= 0.012$). 또한 COX-2 양성군의 골반, 복부대동맥, 쇄골 윗림프절 등을 포함한 전체 림프절 재발율도 COX-2 음성군보다 월등히 높았다(COX-2 양성군; 38%, COX-2 음성군; 75%, $p= 0.003$). 그러나 두 군의 혈행성 전이율은 COX-2 양성군과 COX-2 음성군에서 각각 5%와 7%로 차이가 없었다. 또한 COX-2 양성군이 종양재발까지의 기간이 상당히 짧았는데, 재발까지의 중앙 기간은 COX-2 음성군에서는 26개월, COX-2 양성군에서 9개월이었다($p= 0.003$, log-rank test)(그림 4).

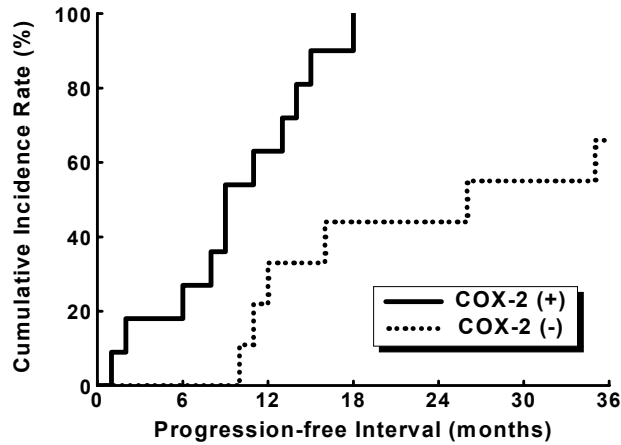


Figure 4. Temporal relationship of the cumulative incidence of failure patterns between the cyclooxygenase-2 (COX) positive patients and the COX-2 negative patients (Kaplan-Meier method).

4. 생존율 및 예후인자(Survival and prognostic factors)

환자의 생존기간에 대해 최소 60개월 이상 추적 조사한 결과 동시 항암화학요법이 시행된 전체 환자의 5년 전체생존율과 무병생존율은 각각 85%와 65%로 나타났다. COX-2 양성군과 음성군으로 나누어 비교해보면 COX-2 양성군의 5년 전체생존율은 56%(95% 신뢰구간, 33-79%)였고 COX-2 음성군은 94%(95% 신뢰구간, 87-99%)였으며 COX-2 양성군의 5년 무병생존율은 47%(95% 신뢰구간, 25-69%)였고 COX-2 음성군은 81%(95% 신뢰구간, 70-92%)로서 COX-2 음성군에 비하여 COX-2 양성군이 불량한 예후를 나타냈다(그림 5).

환자의 예후는 이미 잘 알려진 임상 변수와 연관이 있기 때문에 Cox Regression Analysis를 실시하여 COX-2 발현이 예후에 미치는 영향을 분석하였다. 전체생존율과 무병생존율의 단일변량분석 결과에서 COX-2 과발현과 자궁결조직

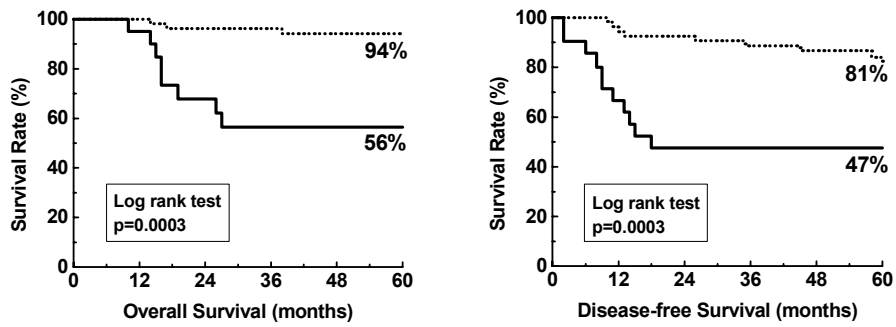


Figure 5. Comparison of the overall actuarial survival and disease-free survival rates in patients according to their cyclooxygenase-2 (COX-2) expression level (Kaplan-Meier method). Patients in the COX-2 positive group (n = 21 patients; solid lines) had a poorer prognosis compared with patients in the COX-2 negative group (n = 54 patients; dotted lines).

의 침범정도가 의미 있는 예후 인자로 확인되었으나(표 3), 다변량분석 결과는 COX-2 과발현만이 독립적인 예후 인자로 통계학적인 의미가 있었다(표 4).

Table 3. Univariate analysis of the prognostic factors

Prognostic Variables	No. of patients	5-year actuarial survival			Statistical significance	5-year disease-free survival		
		%	95% CI ¹			%	95% CI ¹	Statistical significance
Age (years)								
< 55	44	78	65 - 91	NS ⁵	68	53 - 83	NS	
≥ 55	31	93	84 - 100		84	70 - 97		
Tumor Size (cm)								
< 6	54	86	76 - 95	NS	70	57 - 83	NS	
≥ 6	21	80	62 - 98		80	62 - 88		
Parametrial Extension								
Unilateral/Medial ²	31	90	78 - 100	NS	82	67 - 97	NS	
Bilateral/Lateral ³	44	80	68 - 93		65	50 - 80		
Pelvic LN ⁴ Involvement								
No	62	88	79 - 96	NS	75	67 - 97	NS	
Yes	13	67	40 - 94		68	41 - 95		
COX-1 Expression								
Negative	50	85	75 - 97	NS	74	60 - 87	NS	
Positive	25	83	68 - 93		76	59 - 93		
COX-2 Expression								
Negative	54	94	87 - 100	0.0003	81	70 - 93	0.0003	
Positive	21	57	33 - 80		48	26 - 69		

¹CI, confidence interval. ²unilateral and medial-half extension. ³bilateral or lateral-half extension. ⁴LN, lymph node. ⁵NS, not significant.

Table 4. Multivariate analysis of the prognostic factors

Prognostic Variables	5-year actuarial survival			5-year disease-free survival		
	Risk ratio	95% CI ¹	Statistical significance	Risk ratio	95% CI ¹	Statistical significance
COX-2 Expression	8.2	6.9 - 9.5	0.001	5.0	4.0 - 6.0	0.02
Pelvic LN ² Involvement	2.4	1.1 - 3.7	NS ⁴	1.3	0 - 2.6	NS
Tumor Size \geq 6 cm	1.7	0.1 - 3.0	NS	0.7	0 - 2.0	NS
Parametrial Bilateral/Lateral Extension ³	1.5	0.2 - 2.8	NS	2.1	0.5 - 3.7	NS
COX-1 Expression	0.5	0 - 1.8	NS	0.5	0 - 1.7	NS

¹CI, confidence interval. ²LN, lymph node. ³bilateral or lateral-half extension. ⁴NS, not significant.

IV. 고찰

본 연구결과, 대상 자궁경부의 FIGO병기 II B기 편평세포암 환자 75명의 약 30%에서 COX-2의 과발현이 면역조직화학적으로 관찰되었다. 특히 COX-2 양성 환자군에서 중심 실패, 림프질 실패의 빈도가 COX-2 음성 환자군보다 훨씬 더 높았으며 재발까지의 기간도 짧았다. 이러한 결과로부터 COX-2의 과발현은 암종 세포의 공격적인 표현형(phenotype)이며 자궁경부의 편평세포암의 생물학적 공격성을 반영한다고 할 수 있겠다. 뿐만 아니라 COX-2의 과발현은 불량한 예후와 직접적으로 연관되어 있으며, 단일 및 다변량분석결과 모두 독립적인 예후 인자임이 입증되었다. 지금까지 종양의 크기, 림프질 전이, FIGO병기 등이 환자의 생존 예측에 중요한 지표로 인식되어 왔으나 본 연구 결과 자궁경부의 편평세포암 FIGO 병기 II B기로 동시 항암화학요법을 시행된 환자에서 COX-2의 과발현은 종양 재발과 불량한 예후에 대해서 잘 알려진 다른 임상 변수보다 더 유력한 표지자임이 확인되었다.

종양 조직 내의 프로스타글란딘 농도는 해당 정상조직보다 비해 훨씬 더 높다는 사실은 이미 잘 알려져 있다.^{3,5} COX-1과 COX-2 효소에 의한 프로스타글란딘 생합성의 증가에 대해서는 많은 실험 모델을 통하여 생화학적으로 증명되어 있다.^{4,5} 두 동종효소는 세포의 형질내세망(endoplasmic reticulum)이나 핵막(nuclear envelope)등의 세포 소기관(organelle)에서 발견된다.²⁸ 두 동종효소는 유사한 구조, 촉매기전, 생성물과 활동성(kinetic property)등을 갖고 있으나 유전자 표현의 조절, 대사적 및 생리적 기능에서는 현저한 차이를 보이는 것으로 알려져 있다.³ Housekeeping gene인 COX-1의 증가는 소화기(gastrointestinal), 신장(renal), 혈관(vascular)의 항상성(homeostasis) 유지에 필요한 프로스타글란딘의 정상 생리적 생성에 관여하지만 COX-2 발현의 변화는 세포 분화와 복제의 초기에서만 독립적으로 나타나기 때문에 일부 악성 암종에서 빈번히 관찰된다.^{3,29} 그러나 COX-1의 큰 변화는 몇몇 종양에서 관찰되기도 한다.^{3,7} Doré 등은 COX-2가 아닌 COX-1 단백질의 발현이 난소암에서 실질적으로 높다고 기술하였으며 Hwang 등은 역시 유방

암종에서 양성종양이나 정상조직보다 COX-1 단백질이 증가되어있음을 보고하였다.^{30,31} 그러나 지금까지 자궁경부암에서 COX-1의 발현이 완전히 규명되지는 않았다. 본 연구의 면역조직화학염색에서 COX-1 염색은 암세포가 아닌 주위 정상세포에서만 관찰된 반면에 COX-2는 상피암세포에서만 관찰되었을 뿐만 아니라 COX-1 과발현은 COX-2 발현의 결정인자나 자궁경부암 환자의 독립적인 예후 인자가 되지 못하였다.

자궁경부암에서의 COX-2 발현의 임상적 중요성에 대해 Ryu 등은 자궁경부암 FIGO병기 IB기에서 수술 시 얻은 조직에서 COX-2 발현의 증가를 확인하였고 자궁결조직 침범과 림프절 전이와 연관되어 있다고 하였다.²³ Gaffney 등은 방사선 치료만을 받은 자궁경부암 FIGO 병기 IB~IIIB기까지의 환자의 예후와 COX-2 발현 수준간에 상호 밀접한 연관 관계가 있다고 하였다.²⁴ 본 연구에서는 자궁경부의 편평 세포암 FIGO병기 II기로 동시 항암화학요법을 시행 받은 환자에서 COX-2 과발현을 보이는 환자군이 불량한 예후를 보이는 군임을 확인하였다. 종양이 특별히 크지 않거나 예후에 좋지 않은 다른 인자가 없는 경우에도 COX-2 과발현을 보이는 환자군은 높은 중심 실패율과 림프절 실패율을 보일 뿐만 아니라 전체생존율과 무병생존율이 모두 감소되었으며, 이는 수술 단독이나 방사선치료만을 받은 환자에 대한 보고와 일치한다고 하겠다. 또한 COX-2 양성군이 COX-2 음성군에 비해 치료반응이 늦었고 또 조기에 재발하였다. 이는 COX-2 유전자가 세포주기에 영향을 주고 화학요법과 방사선치료에 대한 아포토시스 반응에서도 중요한 역할을 할 가능성이 있다는 것을 시사한다 하겠다.

자궁경부암에서 COX-2가 관여하는 병태생리 반응을 규명하기 위해서는 세포주(cell line)에 대한 심층적인 연구와 세포간의 상호작용의 이해를 위한 임상 연구가 선행되어야 할 것이다. 우선 COX-2는 자궁경부암에서 국소 침윤과 전이능을 조절하는 역할을 하는 것으로 추정된다.^{10,13} 암종 세포의 침윤 정도가 증가하는 것은 세포막 금속 단백질분해 효소-2(membrane metalloproteinase-2)의 활성화와 세포막 금속 단백질분해 효소-1의 전령 RNA(mRNA)의 양적 증가와 연관된다.^{13,29,32} COX-2에 의해 유도되는 이들 효소들은 암종 세포의 침윤과 이동의 표현형을 자극하여 기저막(basement membrane)의 콜라겐 기질(collagen matrix)을 분해한다.²⁹

또한 비스테로이드성 항염증약물(nonsteroidal anti-inflammatory drug, NSAID)의 투여는 COX-2의 증가와 연관 있는 세포의 성장을 감소시키고 아포토시스를 증가시킨다.^{11,12,29} 세포 유착과 아포토시스와는 별도로 COX-2 과발현은 혈관생성(angiogenesis)의 조절자로서의 가능성이 제기되고 있다.^{14,22,29} *In vitro*에서 COX-2의 약리적 억제제는 proangiogenic cytokine과 vascular endothelial growth factor (VEGF) 생성 감소를 유도하고 COX-2 null mice의 종양 성장 감소를 가져온다.^{24,29,33} 뿐만 아니라 항 VEGF 항체와 방사선의 병용이 murine 종양 모형 시스템에서 전리 방사선의 세포살해(cell killing)의 효과를 증진시킨다.³³ 이러한 조건들을 종합적으로 고찰해볼 때 여러 병태생리 반응에 생물학적 영향을 미치고 있는 COX-2는 새로운 분자 표적으로서 상당히 유망한 치료의 대상이 될 수 있음을 유추할 수 있겠다.

새로운 치료법의 하나로 선택적 COX-2 억제제의 발견은 암 치료에 있어서 새로운 분야임이 분명하다. 더욱이 많은 경우에서 소화기계 부작용을 수반하는 COX-1 억제제와는 달리 선택적 COX-2 억제제는 기존의 비스테로이드성 항염증약물보다 소화기 점막에 대한 손상이 훨씬 적어 약제에 대한 부작용이 훨씬 경미하다.^{8,14,29} 뿐만 아니라 몇몇 연구에서 선택적 COX-2 억제제는 암 치료에 있어서 화학요법 민감제(chemosensitizer)나 방사선 민감제(radiosensitizer)로서 잠재력이 입증된 바 있다.^{34,37} Duffey 등과 다른 연구자들은 사람 폐암과 백혈병 세포를 포함한 다양한 세포주에서 선택적 COX-2 억제제가 여러 화학요법제의 항암 효과를 유의하게 증가시킨다는 사실을 보고하였다.^{34,35} 또한 선택적 COX-2 억제제를 이용한 치료는 정상 조직의 방사선민감성에 영향을 주지 않으면서 종양의 반응을 증진시킬 뿐만 아니라 동물 종양 모형에서는 내재적인 종양 세포의 방사선 민감성을 더욱 증가시킬 수 있다는 보고도 있다.^{36,37} 이러한 결과로부터 선택적 COX-2 억제제가 방사선 요법이나 화학요법약제와 병용될 경우 그 부작용을 증대시키지 않고 항암 효과를 더욱 더 증진시킬 수 있다고 할 수 있겠다. 그러나 이러한 가능성을 검증하기 위해서는 보다 정밀하게 계획된 무작위 임상 시험이 반드시 선행되어야 할 것이다.

V. 결 론

COX-2의 과발현은 자궁경부의 FIGO병기 II B기 편평세포암으로 진단받고 동시 항암화학요법을 시행 받은 환자의 예후를 예측할 수 있는 지표가 될 수 있음을 확인하였다. 면역조직화학염색이 실제 임상에서 사용할 수 있는 비교적 용이한 기법이므로 COX-2의 발현은 이와 같은 환자의 치료방침의 결정에 있어서 일상적으로 시행될 필요가 있다. 앞으로 COX-2의 과발현을 보이는 자궁경부암 환자의 치료에서 선택적 COX-2 억제제의 유용성에 대한 연구가 이루어져야 할 것이다.

참고문헌

1. Eifel PJ, Berek JS, Thigpen JT. Cancer of the cervix, vagina and vulva. In: Devita VT, Hellman S, and Rosenberg SA(eds). Cancer: Principles and Practice of Oncology, 6th Edition, Philadelphia: Lippincott. 2001:1526-1556
2. Lyng H, SundfØr K, Tropé C, Rofstad EK. Disease control of uterine cervical cancer: Relationship to tumor oxygen tension, vascular density, cell density, and frequency of mitosis and apoptosis measured before treatment and during radiotherapy. Clin Cancer Res 2000;6:1104-1112
3. Smith WL, Langenbach R. Why there are two cyclooxygenase isozymes. J Clin Invest 2001;107:1491-1495
4. Smith WL, DeWitt DL, Garavito RM. Cyclooxygenases: Structural, cellular, and molecular biology. Ann Rev Biochem 2000;69:145-182
5. Williams CS, Mann M, DuBois RN. The role of cyclooxygenases in inflammation, cancer, and development. Oncogene 1999;18:7908-7916
6. Wolff H, Saukkonen, K, Anttila S, Karjalainen A, Vainio H, and Ristimaki A. Expression of cyclooxygenase-2 in human lung carcinoma. Cancer Res 1998;58:4997-5001
7. Soslow RA, Dannenberg AJ, Rush D, Woerner BM, Kahn KN, Masferrer J, et al. COX-2 is expressed in human pulmonary, colonic, and mammary tumors. Cancer 2000;89:2637-2645
8. Molina MA, Sitja-Arnau M, Lemoine MG, Frazier ML, Sinicrope FA. Increased cyclooxygenase-2 expression in human pancreatic carcinomas and cell lines: Growth inhibition by nonsteroidal anti-inflammatory drugs. Cancer Res 1999;59:4356-4362
9. Eberhart CE, Coffey RJ, Radhika A, Giardiello FM, Ferrenbach S, DuBois RN. Up-regulation of cyclooxygenase-2 gene expression in human colorectal

- adenomas and adenocarcinomas. *Gastroenterol* 1994;107:1183-1188
10. Williams CS, Tsujii M, Reese J, Dey SK, DuBois RN. Host cyclooxygenase-2 modulated carcinoma growth. *J Clin Invest* 2000;105:1589-1594
 11. Tsujii M, DuBois RN. Alterations in cellular adhesion and apoptosis in epithelial cells overexpressing prostaglandin endoperoxide synthase 2. *Cell* 1995;83:493-501
 12. Elder DJ, Halton DE, Hague A, Paraskeva C. Induction of apoptotic cell death in human colorectal carcinoma cell lines by a cyclooxygenase-2 (COX-2)-selective nonsteroidal anti-inflammatory drug: independence from COX-2 protein expression. *Clin Cancer Res* 1997;3:1679-1683
 13. Tsujii M, Kawano S, DuBois RN. Cyclooxygenase-2 expression in human colon cancer cells increases metastatic potential. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:3336-3340
 14. Masferrer JL, Leahy KM, Koki AT, Zweifel BS, Settle SL, Woerner BM, et al. Antiangiogenic and antitumor activities of cyclooxygenase-2 inhibitors. *Cancer Res* 2000;60:1306-1311
 15. Shono T, Tofilon PJ, Bruner JM, Owolabi O, Lang FF. Cyclooxygenase-2 expression in human glioma: Prognostic significance and molecular correlations. *Cancer Res* 2001;61:4375-4381
 16. Kang HJ, Gong G, Jang SJ, Jung PJ, Park CK. Expression of cyclooxygenase-2 in human breast carcinoma: Relevance to tumor angiogenesis and expression of estrogen receptor in Korean. *Cancer Res Treatment* 2001;33:286-295
 17. Khuri FR, Wu H, Lee J, Kemp BL, Lotan R, Lippman SM, et al. Cyclooxygenase-2 overexpression is a marker of poor prognosis in stage I non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 2001;7:861-867
 18. Shamma A, Yamamoto H, Doki Y, Okami J, Kondo M, Fujiwara Y, et al. Up-regulation of cyclooxygenase-2 in squamous carcinogenesis of the

- esophagus. Clin Cancer Res 2000;6:1229-1238
19. Lim HY, Joo HJ, Choi JH, Yi JW, Yang MS, Cho DY, et al. Increased expression of cyclooxygenase-2 protein in human gastric cancer. Clin Cancer Res 2000;6:519-525
 20. Sheehan KM, Sheahan K, ODonoghue DP, MacSweeney F, Conroy RM, Fitzgerald DJ, et al. The relationship between cyclooxygenase-2 expression and colorectal cancer. JAMA 1999;282:1254-1257
 21. Tomozawa S, Tsuno NH, Sunami E, Hatano K, Kitayama J, Osada T, et al. Cyclooxygenase-2 overexpression correlates with tumor recurrence, specially haematogenous metastasis, of colorectal cancer. Br J Cancer 2000;83:324-328
 22. Masunaga R, Kohno H, Dhar K, Ohno S, Shibakita M, Kinugasa S, et al. Cyclooxygenase-2 expression correlates with tumor neovascularization and prognosis in human colorectal carcinoma patients. Clin Cancer Res 2000;6:4064-4068
 23. Ryu HS, Chang KH, Yang HW, Kim MS, Kwon HC, Oh KS. High cyclooxygenase-2 expression in stage IB cervical cancer with lymph node metastasis or parametrial invasion. Gynecol Oncol 2000;76:320-325
 24. Gaffney DK, Holden J, Davis M, Zempolich K, Murphy KJ, Dodson M. Elevated cyclooxygenase-2 expression correlates with diminished survival in carcinoma of the cervix treated with radiotherapy. Int J Radiat Oncol Biol Phys 2001;49:1213-1217
 25. Morris M, Eifel PJ, Lu J, Grigsby PW, Levenback C, Steven RE, et al. Pelvic radiation with concurrent chemotherapy compared with pelvic and para-aortic radiation for high-risk cervical cancer. N Engl J Med 1999;340:1137-1143
 26. Rose PG, Bundy BN, Watkind EB, Thigpen JT, Deppe G, Maiman MA, et al. Concurrent cisplatin-based radiotherapy and chemotherapy for locally advanced cervical cancer. N Engl J Med 1999;340:1144-1153

27. Park TK, Kim SN, Kim SW, Kim GE, Suh CO. Concurrent chemotherapy and radiotherapy in invasive cervical carcinoma patients with high risk factors. *J Korean Med Sci* 2000;15:436-441
28. Spencer AG, Woods JW, Arakawa T, Singer II, Smith WL. Subcellular localization of prostaglandin endoperoxide H synthases-1 and 2 by immunoelectron microscopy. *J Biol Chem* 1998; 273:9886-9893
29. Dannenberg AJ, Altoki NK, Boyle JO, Dang C, Howe LR, Weksler BB, et al. Cyclooxygenase-2: a pharmacological target for the prevention of cancer. *Lancet Oncol* 2001;2:544-551
30. Doré M, Côté LC, Mitchell A, Sirois J. Expression of prostaglandin G/H synthase type 1, but not type 2, in human ovarian adenocarcinomas. *J Histochem Cytochem* 1998;46:77-84
31. Hwang D, Scollard D, Byrne J, Levine E. Expression of cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 in human breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 1998;90:455-460
32. Zhang Y, DeWitt DL, McNeely TB, Wahl SM, Wahl LM. Secretory leukocyte protease inhibitor suppresses the production of monocyte prostaglandin H synthase-2, prostaglandin E2, and matrix metalloproteinases. *J Clin Invest* 1997;99:894-900
33. Gorski DH, Beckett MA, Jaskowiak NT, Calvin DP, Mauceri HJ, Salloum RM, et al. Blockade of the vascular endothelial growth factor stress response increases the antitumor effects of ionizing radiation. *Cancer Res* 1999;59:3374-3378
34. Hida T, Leyton J, Makheja AN, Ben-Av P, Hla T, Martinez A, et al. Non-small cell lung cancer cyclooxygenase activity and proliferation are inhibited by non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Anticancer Res* 1998;18:775-782
35. Duffy CP, Elliott CJ, OConnor RA, Heenan MM, Coyle S, Cleary IM, et al.

Enhancement of chemotherapeutic drug toxicity to human tumor cells in vitro by a subset of non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs). *Eur J Cancer* 1998;34:1250-1259

36. Milas L, Kishi K, Hunter N, Mason K, Masferrer JL, Tofilon PJ. Enhancement of tumor response to α -radiation by an inhibitor of cyclooxygenase-2 enzyme. *J Natl Cancer Inst* 1999;91:1501-1504

37. Kishi K, Petersen S, Petersen C, Hunter N, Mason K, Masferrer JL, et al. Preferential enhancement of tumor radioresponse by a cyclooxygenase-2 inhibitor. *Cancer Res* 2000;60:1326-1331

Abstract

The Clinical Significance of Overexpression of Cyclooxygenase-2 in Patients with Squamous Cell Carcinoma of the Uterine Cervix Treated with Radiation and Concurrent Chemotherapy

Yong Bae Kim

Department of Medicine

The Graduate School, Yonsei University

(Directed by Professor Gwi Eon Kim)

Background: The aim of this study was to determine whether or not cyclooxygenase (COX)-2 overexpression was an indicator of the prognosis of FIGO stage IIB uterine cervical cancer patients who underwent radiation and concurrent chemotherapy.

Materials and Methods: Seventy-five FIGO stage IIB patients with squamous cell carcinoma (SCC) of the uterine cervix, who were treated with radiotherapy and concurrent chemotherapy between 1991 and 1996, were divided into two groups according to their COX-2 level by an immunohistochemical study; (A) the COX-2 negative group (n=54) and (B) the COX-2 positive group (n=21). The clinicopathologic features, patterns of treatment failure, and the survival data for the COX-2 positive patients were compared with those of the COX-2 negative patients. Univariate and multivariate analyses were performed to determine the prognostic factors

influencing the patient survival rate.

Results: In the immunohistochemical study, COX-2 overexpression was observed in approximately 30 % of patients with FIGO stage IIB SCC of the uterine cervix. With delayed regression to the initial treatment, the treatment failure rate of the COX-2 positive patients was much higher than that of the COX-2 negative patients. The higher incidence of central failure and nodal failure for the COX-2 positive patients was statistically significant (48% for the COX-2 positive patients vs 13% for the COX-2 negative patients). However, there was no difference in the incidence of hematogenous metastases between the two groups (5% for the COX-2 positive patients vs 7% for the COX-2 negative patients). In addition, increased COX-2 expression in cancer cells also correlated with the shorter interval to tumor recurrence (median interval to recurrence; 9 months in COX-2 positive patients vs 26 months in COX-2 negative patients). Compared to the COX-2 negative patients, the COX-2 positive patients had lower overall actuarial and disease-free survival rates (overall 5-year actuarial survival rates; 56% for the COX-2 positive patients vs 94% for the COX-2 negative patients)($p=0.003$). Univariate and multivariate analyses showed that COX-2 overexpression is an independent prognostic factor surpassing other well-known clinicopathological parameters.

Conclusions: COX-2 overexpression can be used as a potent molecular risk factor in FIGO stage IIB patients with SCC of the uterine cervix who are treated with radiotherapy and concurrent chemotherapy.

Keywords: cyclooxygenase-2, squamous cell carcinoma, uterine cervical cancer, prognostic factor, radiotherapy with concurrent chemotherapy