

악성 흑색종과 양성 멜라닌세포성 모반에서 MART-1의 발현에 관한 연구

단국대학교 피부과학교실, 연세대학교 피부과학교실*, 연세대학교 병리학교실**, 충남대학교 피부과학교실†

최성환 · 이민걸* · 조상호** · 이중훈† · 박항준 · 신용우 · 김유찬

=Abstract=

MART-1 Expression in Malignant Melanoma and Benign Melanocytic Nevi

Sung Hwan Choe, M.D., Min Geol Lee*, M.D., Sang Ho Cho**, M.D., Jeung Hoon Lee†, M.D.,
Hyang Joon Park, M.D., Yong Woo Cinn, M.D., You Chan Kim, M.D.

Department of Dermatology, College of Medicine, Dankook University, Cheonan, Korea,

Department of Dermatology, Yonsei University College of Medicine*, Seoul, Korea,

Department of Anatomical Pathology, Yonsei University College of Medicine**, Seoul, Korea,

Department of Dermatology, College of Medicine, Chungnam National University †, Taejon, Korea

Background : MART-1(melanoma antigen recognized by T cell) is a well-known marker for malignant melanoma. Its immunoreactivity is also expressed in other melanocytic lineage.

Objective : Our purpose is to evaluate the usefulness of MART-1 in the diagnosis of malignant melanoma.

Methods : MART-1 immunostaining was performed in 26 cases of malignant melanoma and 12 cases of benign melanocytic nevi. HMB-45 immunostaining was performed in 26 cases of malignant melanoma.

Results :

1. Eighteen of 26 melanomas(69%) and 10 of 12 benign melanocytic nevi(83%) showed reactivity with MART-1.

2. HMB-45 showed a higher sensitivity(85%) than that of MART-1 in the staining of malignant melanoma.

3. Two of 5 HMB-45-negative melanomas were immunoreactive with MART-1, and 2 of 7 MART-1-negative melanomas were reactive with HMB-45.

Conclusion :

MART-1 immunostaining is not helpful to differentiate malignant melanoma from benign melanocytic nevi. MART-1 was immunoreactive to some cases of HMB-45 negative malignant melanoma. MART-1, together with S-100 protein and HMB-45, is another useful marker of malignant melanoma. (Korean J Dermatol 2001;39(8) : 878~882)

Key Words : MART-1, Malignant melanoma, Benign melanocytic nevi

<접수:2001년 6월 29일>

*이 연구는 2000학년도 단국대학교 대학연구비의 지원으로 시행되었음

교신저자 : 김유찬

주소 : 330-714 충남 천안시 안서동 16-5
단국대학교 의과대학 피부과학교실
전화 : (041)550-3968 Fax : (041)562-6542

E-mail : kycce@anseo.dankook.ac.kr

서 론

1994년 Kawakami 등¹과 Coulie 등²은 각기 같은 유전자를 클론(clone) 한 후 각각 melanoma antigen recognized by T cells (MART-1)과 Melan-A라 명칭하였다. MART-1/Melan-A은 흑색종 세포에 의해 발현되며 CD8 양성 T세

포에 의해 인지되는 항원으로 이것의 기능은 알려져 있지 않다. MART-1은 신선조직 및 파리핀 포매된 조직에서 멜라닌세포 및 흑색종 세포의 세포질에 염색됨으로서 흑색종에 대한 새로운 표지자로서의 사용가능성이 최근 제시되었다^{3,4}. 전이성 악성흑색종의 진단에 있어서 MART-1의 유용성을 밝히는 연구가 최근 많이 이루어졌지만⁵ 원발성 악성흑색종 또는 양성 멜라닌세포성 모반에서 MART-1의 발현에 관한 연구는 드물다⁶. 저자들은 국내에서는 처음으로 악성 흑색종과 양성 멜라닌세포 모반에서 MART-1의 발현정도를 관찰하고 기존의 악성흑색종의 표지자인 HMB-45의 발현정도와 비교 관찰함으로서 악성흑색종의 진단에 있어서 MART-1 항체의 유용성을 알아보고자 하였다.

연구대상 및 방법

1. 연구대상

연세대학교 신촌 세브란스 병원, 단국대학교 병원, 충남대학교 병원에서 임상 및 병리조직학적으로 확진된 악성 흑색종 26예와 양성 멜라닌세포성 모반 12예를 임의로 선택하였다.

2. 연구방법

일정한 조직처리를 거쳐 파라핀에 포매된 조직을 박절기를 이용하여 4μm의 두께로 절편을 만들어 면역조직화학 염색을 시행하였다. 면역염색은 LSAB(labelled streptavidin-biotin)를 이용한 ABC method를 사용하였다. 염색의 전 처리로 파라핀 제거를 위해 xylene에 5분씩 4회 처리하였으며, rehydration을 위해 100% alcohol에 5분씩 2회 그리고 95% alcohol에 5분씩 2회, 수돗물로 1회 5분간 세척한 후 내재성 peroxidase activity를 제거하기 위해 3%過산화수소수(H₂O₂)로 약 15분간 담근 후 수돗물, phosphate buffered saline(PBS)로 각각 5분씩 세척하고 Shandon im-

Fig. 1. Strong cytoplasmic staining for MART-1 in most tumor cells of malignant melanoma(×100).

Fig. 2. Strong cytoplasmic staining for MART-1 in most epidermal melanocytes and dermal nevus cells of benign melanocytic nevus(×50).

Fig. 3. Malignant melanoma stained with MART-1 (A, ×25), but not with HMB-45(B, ×25).

munostaining system에 장착하였다. 다시 한번 PBS로 5분간 세척한 후 조직의 비특이적 결합을 막기(blocking) 위해 혈청으로 15분간 처리한 후 적당 비율로 회석된 항체들을 1시간 동안 부양하였다. PBS로 5분간 세척한 후 2차 항체를 30분간 부양하고, 다시 PBS로 5분간 수세한 뒤 streptavidin-peroxidase complex를 30분간 부양하였다. 발색제로는 DAB(3,3'-diaminobenzidine)와 ACE(3-amino-9-ethylcarbazole)를 사용하였으며 발색시간은 5분으로 하였다. 발색과정 후 다시 PBS로 5분간 세척하고 Mayer's Hematoxylin으로 3분간 대조염색을 시행한 후 수용성 봉입제로 봉입하고 광학현미경으로 관찰하였다. 사용된 1차

항체로는 MART-1(Neomarker, Fremont, CA, USA)을 $2\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 사용하였으며 HMB-45(DAKO, Carpinteria, CA, USA)는 $31\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 회석하여 사용하였다.

3. 결과 판정

HMB-45와 MART-1 염색 모두 종양세포의 세포질이 염색되는 경우를 양성으로 판정하였다. 전체 종양세포 중 반응을 보이는 세포들이 차지하는 정도를 25%이하, 25-50%, 50-75%, 75%이상으로 표시하였다. 염색정도는 강양성은 +++, 중양성은 ++, 약양성은 +로 분류하였다.

Table 1. Clinicopathologic and immunohistochemical findings in 26 malignant melanoma cases

Case	Type	Sex/Age	Thickness of tumor (mm)	MART-1		HMB-45	
				Intensity	Extent(%)	Intensity	Extent(%)
1	ALM	M/60	2.5	++	50-75	+	25-50
2	ALM	M/51	1.3	-	-	++	25-50
3	ALM	F/56	1.1	++	25-50	++	25-50
4	ALM	F/64	>6.5	-	-	-	-
5	ALM	F/71	3.4	+	25-50	+	focal
6	ALM	M/65	2.4	+++	>75	++	25-50
7	ALM	F/58	0.6	-	-	++	<25
8	ALM	M/74	6.1	-	-	+	25-50
9	ALM	M/78	1.8	++	25-50	+	50-75
10	ALM	M/76	2.0	-	-	+	<25
11	ALM	M/72	2.5	+++	50-75	++	>75
12	ALM	M/51	1.6	-	-	++	25-50
13	ALM	F/73	0.4	++	25-50	++	25-50
14	ALM	M/75	2.9	++	25-50	-	-
15	ALM	M/49	2.4	-	-	-	-
16	ALM	M/25	>4.0	+++	>75	+++	>75
17	Nodular MM	F/73	4.0	+++	>75	-	-
18	Nodular MM	F/73	0.8	+++	>75	++	<25
19	Nodular MM	M/58	>6.0	++	>75	++	25-50
20	Desmoplastic MM	M/62	7.5	-	-	+	<25
21	Lentiginous MM	M/82	3.5	+++	>75	++	25-50
22	Superficial spreading MM	F/38	0.1	+++	>75	+++	>75
23	Superficial spreading MM	F/63	>4.0	+++	>75	+++	>75
24	Metastatic MM	M/72	8.2	+++	>75	+++	50-75
25	Metastatic MM	F/66	3.9	+	<25	+	<25
26	Metastatic MM	F/60	>4.0	++	>75	++	25-50

ALM ; acral lentiginous melanoma

MM ; malignant melanoma

Table 2. Results of MART-1 and HMB-45 staining in malignant melanomas and benign melanocytic nevi

	MART-1	HMB-45
Malignant melanoma	18/26 (69%)	22/26 (85%)
Benign melanocytic nevi	10/12 (83%)	ND
ND ; not done		

결 과

1. 임상 및 병리조직학적 소견

총 26예의 흑색종은 남자 15예, 여자는 11예였고 평균 연령은 63.1세였다. 병변의 발생 부위는 뒷꿈치 10예, 발바닥 4예, 체간 3예, 엄지 손가락 2예였다. 병리조직학적으로는 선단 흑자성 흑색종이 16예, 전이성 병변이 3예, 결절성 흑색종이 3예, 조직형성성 흑색종은 1예, 표재 확장성 흑색종 2예, 악성 흑자 1예였다. 종양의 두께는 0.7 mm이하가 3예, 0.7-1.69mm가 4예, 1.7-3.596mm가 10예, 3.6 mm 이상이 9예였다(Table 1).

양성 멜라닌세포성 모반은 선천성 멜라닌세포성 모반 4예, 복합 모반 4예, 진피모반 2예, 신경양 모반 2예였다.

2. 면역조직학적 소견

1) MART-1 발현

악성 흑색종 26예 중 18예(69%)에서 MART-1에 양성이었다(Table 2). 염색이 된 경우를 반응 정도에 따라 분류 하면 강양성이 9예(50%), 중양성이 6예(39%), 약양성이 2예(11%) 이었다(Fig. 1).

양성 멜라닌세포성 모반은 12예 중 10예(83%)에서 양성이었으며 음성인 경우는 신경양 모반 1예, 복합 모반 1예였다. 양성인 경우는 강양성이 3예 (30%), 중양성이 6 예 (60%), 약양성이 1예 (10%)이었으며 표피와 진피의 경계부위나 진피의 위치와 상관없이 대부분의 모반세포들이 염색되었다(Fig. 2).

2) HMB-45의 발현

악성 흑색종 26예 중 22예(85%)에서 HMB-45에 양성이었으며 양성인 경우는 강양성이 4예(18%), 중양성이 11예(50%), 약양성이 7예(32%) 이었다.

고 찰

세포독성 T세포에 의해 인지되는 악성 흑색종 항원 중 멜라닌세포 분화 항원으로는 MART-1/Melan-A, tyrosinase, gp100(HMB-45의 항원), TRP1, TRP2 등이 있다¹. MART-1은 118개의 아미노산으로 구성된 전달막 단백(transmembrane protein)으로 이것의 유전자는 인간의 흑색종 세포주인 SK-MEL-29에서 동정되었으며, MART-1 mRNA가 멜라

닌세포 및 대부분의 흑색종 세포주에서 발현되어 MART-1이 멜라닌세포에 특이한 항원으로 제시되었다^{1,2}. MART-1에 대한 단클론성 항체는 각기 다른 연구자들에 의해 개발되었는데 Chen 등⁷에 의한 A103과 Fetch 등³에 의한 M2-7C10이 있다. 이번 연구에서는 A103을 사용하였다. MART-1과 gp100이 모두 멜라닌세포 분화 항원이며 세포질 단백이지만 서로 다른 특징이 있다. gp100은 유전적 및 구조적으로 멜라노좀 단백의 family와 연관되어 있으나 MART-1은 크기가 훨씬 작은 단백으로 이것이 멜라노좀 구성요소인지는 명확치 않다. MART-1은 비활동성 멜라닌세포에서도 발현되어 양성 멜라닌세포성 모반의 모든 부위에서 발현되지만 gp100은 비활동성 멜라닌세포에는 발현되지 않아 양성 멜라닌세포 모반의 표피와 진피 경계부위에서만 발현된다⁵.

이번 연구에서 MART-1항체는 다른 연구결과⁸와 마찬가지로 멜라닌세포 계열의 세포에서만 양성을 보였으며 피부내 다른 성분인 각질형성세포, 혈관, 혈관세포, 아포크린 및 에크린 한선 등에서는 음성이었다. 악성 흑색종에 대한 MART-1 면역 염색의 양성을 71-100%^{5,6,8-10}로 보고되었다. 이번 연구에서 MART-1의 양성을 지금까지 보고된 결과에 비해 비교적 낮은 69%이었다. 이것은 조직의 고정과정이나 염색할 당시의 조직상태 등에 따라 약간의 차이를 보일 수 있을 것으로 생각된다.

MART-1은 양성 멜라닌세포성 모반에서 72-100%에서 염색되며, 음성을 보이는 경우는 대부분 신경양 모반으로 보고되었다^{5,6,8}. 또한 HMB-45가 복합모반의 진피부위와 진피내 모반에서 대부분 음성인 것과 달리 MART-1은 모반세포의 위치에 상관없이 대부분 양성이다⁶. 이번 연구에서 12예 중 10예 (83%)에서 양성을 보였으며 음성반응을 보인 예는 진피모반 1예와 신경양 모반 1예이었다. 나머지 신경양 모반 1예는 약하게 MART-1항체에 염색되었다. 양성을 보인 모반은 표피와 진피의 경계부위나 진피내에서의 위치와 상관없이 대부분의 모반세포들이 염색되었다.

Kageshita 등⁸은 악성흑색종의 면역염색 양성을 MART-1이 HMB-45보다 더 높았고 염색정도(intensity)도 더 강하였다고 보고하였다. 이번 연구에서는 MART-1은 악성 흑색종의 69%에서 양성을 보여 HMB-45의 85%보다 약간 낮은 민감도를 보였다. 그러나 염색된 종양세포들의 염색

정도는 MART-1이 더 강하였다(Figure 3A,B). 결합조직형성(desmoplastic) 악성흑색종의 면역염색에 있어서 MART-1은 S-100 단백보다는 양성을 더 낮지만 HMB-45보다는 높은 것으로 보고되었다⁶. 반면, 이번 연구에서는 비록 1 예를 대상으로 하였지만 MART-1에 음성이었고 HMB-45에는 표피와 진피의 경계부위에 있는 종양세포들만이 양성이었다. 따라서 이 두 면역염색의 의의있는 비교를 위해서는 더 많은 예가 포함되어야 할 것이다.

MART-1에 대한 초기연구에서는 MART-1이 멜라닌세포 계열의 세포에만 특이하게 표현되는 것으로 보고되었다^{1,2}. 하지만 그후 MART-1의 항체인 A103이 스테로이드세포(steroid cells) 및 혈관 근지방종(angiomyolipoma) 등에 양성을 보임이 밝혀졌다⁵. 이와같이 MART-1이 멜라닌세포에만 특이적이지는 않지만 비멜라닌세포들은 임상 및 조직학적으로 쉽게 감별되므로 멜라닌세포성 병변의 진단에 MART-1항체는 유용하다고 할 수 있다. HMB-45도 혈관 근지방종, 유방암, 갈색세포종(pheochromocytoma), 신경교육종(gliosarcoma), 상의세포종(ependymoma) 등에 양성을 보이므로 멜라닌세포에만 특이한 것은 아니다¹¹. S-100 단백은 멜라닌세포에 가장 민감하여 악성흑색종의 진단시 가장 흔히 사용되는 항체이다. 그러나, 슈반세포, 랑제르ハン스 세포, 수지상 망상 세포(dendritic reticulum cell), 근상피 세포(myoepithelial cells), 지방세포 등에도 양성이므로 S-100 단백으로 악성흑색종을 악성 슈반세포종, 수지상 망상 세포 육종 등의 종양과 감별할 수는 없다¹¹. 따라서 이들 표지자와 비교할 때 MART-1항체는 악성흑색종을 비롯한 멜라닌 세포 계통의 세포에 비교적 특이성이 높은 표지자라고 할 수 있다.

결 론

1. MART-1항체는 악성흑색종의 26예 중 18예 (69%)에서 양성이었으며 양성 멜라닌세포성 모반에서는 12 예 중 10예 (83%)에서 양성을 보였다.
2. 악성흑색종의 면역염색에서 MART-1(69%)은 HMB-45 (85%) 보다 약간 낮은 양성을 나타내었다.
3. HMB-45에 음성인 악성흑색종 5예 중 2예에서 MART-1에 양성을 나타내었으며 MART-1에 음성인 악성흑색종 7예 중 2예에서 HMB-45에 양성을 보여 악성흑색종의 진단에 MART-1과 HMB-45가 서로 보완 관계를 가짐을 알 수 있었다.

이상의 결과로 볼 때 MART-1은 악성흑색종과 양성 멜라닌세포성 모반과의 감별진단에는 도움을 못 주지만, HMB-45에 음성을 보이는 악성흑색종에서 양성을 나타낼 수 있어 S-100 단백 및 HMB-45와 함께 악성흑색종과 다른 비멜라닌세포 종양과의 감별에 사용될 수 있는 새로

운 표지자라고 생각된다.

* 본 연구의 면역화학염색에 기술적으로 도움을 주신 단국대학교병원 해부병리과 이재환 선생님께 감사드립니다.

참 고 문 헌

1. Kawakami Y, Eliyahu S, Delgado CH et al. Cloning the gene coding for a shared human melanoma antigen recognized by autologous T cells infiltrating into tumor. Proc Natl Acad Sci USA 1994;91:3515-3519
2. Coulie PG, Brichard V, Van Pel A et al. A new gene coding for a differentiation antigen recognized by autologous cytotoxic T lymphocytes on HLA-A2 melanomas. J Exp Med 1994;180:35-42
3. Fetsch PA, Cormier J, Hijazi YM. Immunocytochemical detection of MART-1 in fresh and paraffin embedded melanomas. J Immunother 1997;20:60-64
4. Schach CP, Smoller BR, Hidson AR, Horn TD. Immunohistochemical stains in dermatopathology. J Am Acad Dermatol 2000;43:1094-1100
5. Jungbluth AA, Busam KJ, Chen Y-T, et al. A103- an anti-Melan-A/MART-1 monoclonal antibody for the detection of malignant melanoma in paraffin embedded tissues. Am J Surg Pathol 1998;22:595-602
6. Busam KJ, Chen YT, Old LJ, et al. Expression of Melan-A(MART1) in benign melanocytic nevi and primary cutaneous malignant melanoma. Am J Surg Pathol 1998; 22:976-982
7. Chen YT, Stockert E, Jungbluth A, et al. Serological analysis of Melan-A (Mart-1), a melanocyte-specific protein homogeneously expressed in human melanomas. Proc Natl Acad Sci USA 1996;93:5915-9
8. Kageshita T, Kawakami Y, Hirai S, Ono T. Differential expression of MART-1 in primary and metastatic melanoma lesions. J Immunother 1997;20:460-465
9. Mehregan DR, Hamzavi I. Staining of melanocytic neoplasms by melanoma antigen recognized by T cells. Am J Dermatopathol 2000;22:247-250
10. Bergman R, Azzam H, Sprecher E, Manov E, Maunichor M, Friedman-Birnbaum R. A comparative immunohistochemical study of MART-1 expression in Spitz nevi, ordinary melanocytic nevi, and malignant melanomas. J Am Acad Dermatol 2000;42:496-500
11. Orosz Z. Melan-A/Mart-1 expression in various melanocytic lesions and in non-melanocytic soft tissue tumours. Histopathology 1999;34:517-525