

위암에서 *ex vivo* Model을 이용한 MMP-9에 대한 Gabexate Mesylate IC₅₀의 응용: 예후인자 및 치료대상 선정기준

연세대학교 의과대학 ¹연세 암센터, ²내과학교실, ³외과학교실

문용화¹ · 양 훈¹ · 정희철^{1,2} · 라선영^{1,2} · 김태수¹ · 유내춘^{1,2}
노성훈^{1,3} · 노재경^{1,2} · 민진식^{1,3} · 김병수¹ · 정현철^{1,2}

Application of Gabexate Mesylate IC₅₀ against MMP-9 Using *ex vivo* Model in Gastric Cancer: Prognostic Factor and Selection Criteria for Anti-MMP Treatment

Yong Wha Moon, M.D.¹, Hoon Yang, M.D.¹, Hei Chul Jung, M.D.^{1,2}
Sun Young Rha, M.D.^{1,2}, Tae Soo Kim, M.D.¹, Nae Choon Yoo, M.D.^{1,2}
Sung Hoon Noh, M.D.^{1,3}, Jae Kyung Roh, M.D.^{1,2}, Jin Sik Min, M.D.^{1,3}
Byung Soo Kim, M.D.¹ and Hyun Cheol Chung, M.D.^{1,2}

¹Yonsei Cancer Center, Departments of ²Internal Medicine, ³General Surgery,
Yonsei University College of Medicine, Seoul, Korea

Purpose: Among the many biological characteristics of cancer, matrix metalloproteinases (MMPs) are essential for tumor invasion and metastasis. The correction of the imbalance between MMPs and tissue inhibitors of matrix metalloproteinase (TIMP) has been suggested as a possible goal for the control of invasive phenotype of the cancer. To test the possible inhibition of MMP-9 in *ex vivo* model and the selection of the patients who are sensitive to MMP inhibitory (MMPI) treatment, we evaluated IC₅₀ of the gabexate mesylate (Foy) against MMP-9 and compared them to the clinical parameters and patients survivals.

Materials and Methods: Thirty-four paired normal and gastric cancer tissues were tested for the IC₅₀ of the gabexate mesylate. MMP-9 activity was measured by zymography.

Results: MMP-9 expression (percent of sample band density to control band) (p=0.04) and IC₅₀ (p=0.02) of cancer tissues were significantly higher than those of normal tissues. Cancer tissue IC₅₀ was higher than that of normal tissues in cases when the tumor mass diameter was longer than 5 cm (p=0.03) as well as in higher T-stage (p=0.04), lymph node metastasis (p=0.04) and in advanced stages (p=0.04). There was a tendency of increased IC₅₀ of diffuse and mixed type than that of intestinal type (diffuse & mixed:

11.0±20.8 mg/ml, intestinal: 2.7±3.9 mg/ml; p=0.07), in spite of no difference in MMP-9 expression (diffuse & mixed: 40.3±49.2%, intestinal: 51.0±58.0%). In early gastric cancer (EGC), there was no difference in IC₅₀ between normal and cancer tissues whereas cancer tissue IC₅₀ was higher than that of normal tissue in advanced gastric cancer (p=0.02). There was a tendency of increment of IC₅₀ in cancer tissues of advanced gastric cancer than that of EGC whereas no difference was found in MMP-9 expression between these types of cancers. Poor prognosis was found in high IC₅₀ patients in curatively resected patients (p=0.04). In multivariate analysis, high IC₅₀ was suggested as a possible independent prognostic factor.

Conclusion: We could differentiate the high risk patients using IC₅₀ of gabexate mesylate in *ex vivo* model. This model can be applied in detecting patients with poor prognosis and patients who can have a possible benefit with MMPI treatment.

Key Words: Matrixmetalloproteinase-9, Gabexate mesylate, IC₅₀, Stomach neoplasm

서 론

암 치료 실패에 의한 환자사망의 주된 원인은 암의 전이이다. 암의 전이는 암 증식에 따른 이차적인 과정이 아니라 능동적인 과정으로(1), 많은 경우의 환자에서 암 진단시 이미 전이가 동반되어 있으며, 이 경우 치유가 어렵고 장기생존율이 낮다. 따라서 암의 치료는 곧 전이의 억제 또는 조절과 직결된다고 할 수 있다. 암의 증식과 전이를 위해 필수적인 신생혈관형성의 다단계 과정이 밝혀지면서 이 중 특정 단계를 차단하여 암을 치료하고자 하는 기초 연구 및 임상 시험이 활발히 진행 중이다.

이 중에서도 신생혈관 생성의 첫 단계인 기저막 용해 단계가 중요한 전이 조절 단계로 제시되었다. 전이능이 있는 암세포는 기저막에 부착시에 용해구역(zone of lysis)을 형성한 뒤 기저막을 분해시킴이 확인되었다(1). 이와 같은 기저막 파괴에는 여러 종류의 단백질분해효소들이 관여하며, 그 중에서도 matrix metalloproteinase (MMPs)가 결합 조직의 단백을 파괴하여 암의 전이를 유발할 뿐 아니라, 정상 조직의 증식, 발달, 조직재생 및 상처치유에서도 중요한 역할을 담당한다(2).

MMPs는 세포외 기질을 용해하는 효소로서 암의 전이와 관련하여 처음에는 주로 기저막 용해 등 extravasation에 관여할 것으로 생각되었으나(3), 최근에는 일차성 및 전이성 종양의 증식 및 혈관생성에 직접 관여하여 전이에 미치는 영향이 광범위하다는 개념이 세워지고 있다(4). MMPs의 자연적 억제제인 TIMPs (tissue inhibitors of metalloproteinase) 역시 전이억제 효과 이외에 종양증식 기능도 있으며, 암세포 주위의 미세환경에 따라 TIMPs의 작용이 달리 나타나는 실험결과들이 제시되고 있다. MMPs와 TIMPs의 불균형에 의한 암의 전이가 발생함에 따라 이들 불균형을 억제하는 치료법에 대한 연구가 활발하며, MMPs를 직접 억제하는 제제도 개발되어 일부는 이미 임상시험에 진입하였다(5).

우리 나라에서 가장 흔한 위암은 조기 위암의 경우 근치적 절제술만으로 우수한 치료성적을 보이고 있으나, 주변조직에 침윤하거나 기타 장기로 전이한 경우 예후가 매우 불량하다. 위암은 조직학적 유형, 임상·역학적 행태가 다양함에도 불구하고 림프절 또는 원격전이 이외의 특별한 예후 인자는 없는 실정이다. MMPs의 생성 및 활성률은 위암의 침윤과 전이에 관계가 깊으며, 이들이 위암의 침윤과 전이를 억제시킬 수 있는 생물학

적 치료의 목표가 될 가능성도 제시되었다(6). 또한 정상 조직보다 암조직에서 MMP-2의 발현이 높으며, 세포외기질 관련항원과 TIMP-2도 위암의 중요한 예후인자로 응용될 가능성도 제시되었다(7).

Gabexate mesylate (Foy)는 비펩타이드형 단백질분해효소 저해제(serine proteinase inhibitor)로서 급성 췌장염, 범발성혈관내혈액응고증 등의 치료제로 임상에서 널리 쓰이고 있는 약물이다(8). Serine protease에 의해 plasminogen으로부터 plasmin이 생성되며, 이 plasmin이 종양기질을 생성하고 MMPs를 활성화시킨다. 따라서 Gabexate mesylate에 의해 serine protease를 억제함으로써 종양기질의 구성성분을 변화시킬 뿐 아니라, urokinase-type plasminogen activator (uPA)/plasminogen system에 의해 활성화되는 MMPs 억제가능성을 가정할 수가 있다. 실제 Sundbeck등(9)은 tranexamic acid에 의해 fibrin으로 구성되는 종양기질의 형성을 간접적으로 억제시킨 결과, 종양혈관의 생성을 억제시켜 항 종양효과를 유도함을 보고하였다. 따라서 본 연구에서는 위암조직에서 발현율이 높은 MMP-9에 대한 gabexate mesylate의 50% 억제효과(IC₅₀)를 다른 임상적 예후 요인들과 비교함으로써 위암의 *ex vivo* 연구모델에서 gabexate mesylate에 의한 MMP-9의 억제능이 독립적인 하나의 예후인자로서 응용될 수 있는 가능성을 검증하고, MMP-9의 억제능을 이용하여 MMPs 억제치료를 시행하는 환자대상군을 선정할 수 있는지에 대한 가능성을 조사하였다.

대상 및 방법

1) 대상

1994년 4월부터 1995년 5월까지 연세대학교 의과대학 연세 암센터에 내원하여 위선암이 확진되고 위절제술이 시행된 환자 중, 동일 환자에서 정상 위조직과 암 조직의 채취가 가능하였던 환자 34예를 대상으로 하였다. 근치적절제는 D₂₋₃ 절제술 후 복막, 장막, 간의 침범이 없을 뿐만 아니라, 조직학적으로 위절제면에 암세포가 관찰되지 않

는 경우로 하였고 고식적 절제는 그 이외의 모든 경우를 포함하였다. 근치적 절제는 22예에서, 고식적 수술은 12예에서 시행되었다.

수술로 제거한 환자의 조직을 formalin에 고정 후, paraffin block을 만들고 H&E 염색에 의해 침윤도와 림프절 전이 여부를 결정한 다음 AJCC (1998) 기준에 의해 병리학적 병기를 정하였다. D₃ 이상의 절제술을 하거나 para-aortic 림프절 sampling을 시행한 후 AJCC 기준상 N2 이상의 영역에서 림프절 전이가 확인된 경우에는 림프절 전이 정도를 Japanese Research Society for Gastric Cancer에서 제정한 규칙(1981)을 따랐다.

환자는 수술 후 외래에서 정기적 검진에 의해 추시 관찰하였으며, 추적이 중단되었던 환자는 엽서 및 전화로 추적하였다. 무병생존기간은 수술일로부터 재발이 확인된 날까지로 하였고, 전체 생존기간은 수술일로부터 최종관찰일(1998년 12월) 또는 사망일까지로 하였다. 최소 1개월에서 최대 56개월까지 추적관찰을 하였다(중앙값: 21.5개월). 그의 대상 환자의 임상적 특성은 Table 1과 같다. 정상조직은 육안적으로 원발병소의 변연에서 최소 5 cm 이상 떨어진 부위에서 채취하였다. 정상 조직과 암조직은 수술적 제거 후 고정시키기 전에 추출하여 -70°C에 냉동보관하면서 검사를 하였다.

2) 사용약제

비펩타이드형 단백질분해효소 저해제로 임상에서 널리 쓰이고 있는 약물인 gabexate mesylate (Foy)를 MMP-9의 억제제로 사용하였다.

3) 방법

(1) Zymography에 의한 matrix metalloproteinase-9의 band density측정:

① Tissue extracts preparation; 조직 200 mg을 분해시킨 후 ultracentrifuge 시험관에서 homogenization buffer를 사용하여 10 volume으로 희석시켰다. Homogenizer를 사용하여 5초 이내로 조직을 homogenizer한 다음 4°C에서 1시간 동안 100,000

Table 1. Patient characteristics

Number of enrolled patient	34
sex (M : F)	23 : 11
Age (years)	
Median	55
Range	26 ~ 84
Tumor location	
Body	13
Antrum	19
Cardia	1
Diffuse	1
Pathological type	
Adenocarcinoma	27
Signet ring cell	4
Papillary adenocarcinoma	1
Mucinous adenocarcinoma	1
Adenosquamous carcinoma	1
Operation type	
Curative	22
Palliative	12
Size	
Range (cm)	2 ~ 15
Median (cm)	6
T factor	
T1	4
T2	4
T3	0
T4	26
N factor	
N0	9
N1	5
N2	12
N3	7
N4	1
Stage	
I	7
II	1
III	12
IV	14
Lauren's classificaton	
Intestinal	12
Diffuse	16
Mixed	6

g로 원심분리시켰다. Extracts의 상층액을 얼음 위에 장치한 시험관내로 이동시킨 다음, 실험에 사용하였다.

② Marker 세포주 배양; RPMI-7951 악성 흑색 세포종 세포주와 HT-1080 세포주를 37°C의 0.5%

CO₂ 세포배양기에서 10% 우태아 혈청이 함유된 세포배양배지로 배양하였다. 세포의 건강상태를 유지하기 위해 주 2회 배지를 교환하였다.

③ Gelationase marker; RPMI-7951 악성흑색종 세포주 배양에서 추출한 conditioned media를 72 kD의 표지자로 사용하였다. HT-1080 세포주의 conditioned media는 92 kD와 62 kD의 표지자로 사용하였다. Zymography시에 20 μl의 conditioned media를 5 μl의 5x의 검체 완충액에 혼합한 후, 이 중 10 μl를 취하여 검사하였다.

④ Buffer preparation; Renaturing buffer는 Triton X-100을 증류수에 용해하여 2.5%로 하여 사용하였다. Developing buffer는 50 mM Tris, 0.2 M NaCl, 5 mM CaCl₂, 0.02% Brij 35를 최종 농도로 혼합한 후 HCl을 이용하여 pH를 7.6으로 조절하여 사용하였다. Sample buffer (2x)는 0.5 M Tris-HCl, 10% SDS 4 ml, 0.1% bromophenol blue 0.5 ml, glycerol 2.0 ml를 혼합한 후 증류수를 10 ml 용량이 되도록 첨가하여 사용하였다. Running buffer (10x)는 Tris-base 29 g, glycine 144 g, SDS 10 g을 증류수에 녹인 후 최종용량이 1 L가 되게 하여 사용하였다.

⑤ Zymography; Extracts를 20 μg의 protein이 포함되도록 취하고, Foy 회석액(20 mg/ml, 2 mg/ml, 0.2 mg/ml)을 8 μg 넣은 후 37°C에서 30분간 반응시켰다. Sample (cytosol + Foy 회석액)과 동량의 non-reducing sample buffer (2x)를 섞고 실온에서 10분간 반응시킨 후 125 V에서 3시간 동안 전기영동시켰다(10). 전기영동 후 gel을 renaturing buffer로 실온에서 30분간 반응 후 renaturing buffer를 버리고 metalloproteinase developing buffer로 30분간 반응시킨 다음 세척하고, 다시 신선한 developing buffer에 gel을 담아 정확히 37°C의 온도에서 18시간 동안 흔들면서 반응시켰다. 그리고 0.5% Coomassie blue (Coomassie blue 1.0 g, acetic acid 50 ml, methanol 150 ml, DW 300 ml) 염색액에서 3시간 동안 37°C에서 염색한 후 세척하였다. Gel을 destain solution에 담아 37°C에서 12시간 탈색시킨 후 computer-assisted image analyzer를 이용하여

각 band의 density를 측정, 분석하였다. Marker로는 HT1080 세포주의 conditioned media를 사용하였다.

⑥ Zymography 판독 및 IC₅₀의 결정; Band의 발현여부를 육안적으로 확인한 다음 density를 측정하였다. 검체가 loading되지 않아 gelatinase가 작용하지 않은 lane의 gel density를 image analyzer에서 기저선(0)으로 잡은 다음, 각 검체의 band density를 검체별로 관찰된 그래프의 peak로 수치화하였다(Fig. 1). 각각의 gel은 3회 image 촬영 후 band density를 측정하고 그 평균치를 사용하였다. 각 실험간의 오차를 줄이기 위해 검체의 band density와 marker band (92 kD) density의 비로서 MMP-9의 발현량을 구하였다(percent band density to control). IC₅₀는 Foy를 처치하지 않은 대조군의 band density에 비해서 검체의 MMP-9 band density를 50% 감소시키는 Foy의 농도로 하였다.

(2) IC₅₀ 비교: 정상 조직의 IC₅₀의 평균값은 0.8

mg/ml (범위: 0~3.2 mg/ml)였으며, 정상조직에서 나타나는 IC₅₀의 상한값을 정상조직 IC₅₀의 평균 + 2×표준편차(2.6 mg/ml)로 임의로 정한 다음, 이 보다 높을 경우를 IC₅₀가 높은 군으로 정의하였다(Table 2). 따라서 암조직에서의 IC₅₀가 2.7 mg/ml 이상인 그룹을 'high IC₅₀'군으로, 2.7 mg/ml 미만인 그룹을 'low IC₅₀'군으로 분리하였다.

(3) 통계적 처리: 임상인자별 및 침습정도에 따른 정상조직과 암조직에서의 IC₅₀의 비교는 paired t-test를 이용하였고 IC₅₀과 임상인자들과의 상관성은 Pearson's chi-square test, Fisher's exact test를 사용하였다. Kaplan-Meier 방법을 이용하여 생존곡선을 구하고 log-rank test와 generalized Wilcoxon test를 이용하여 유의성을 검정하였다. 그리고 Cox의 비례위험회귀모형(Cox's proportional hazards model)을 이용하여 혼란변인을 보정하지 않은 단변량분석(univariate analysis)과 혼란변인을 보정한

Fig. 1. Zymographic assay of IC₅₀: A. Bands in real time view. M: maker, C: control without foy pre-treatment, D1: foy 20 mg/ml, D2: 2 mg/ml, D3: 0.2 mg/ml, B. Peaks which represents band density by image analysis.

Table 2. Comparison of band density and IC₅₀ between normal and cancer tissues

	Normal*	Cancer*	p-value
IC ₅₀ (mg/ml)	0.8 ± 0.9	8.2 ± 17.4	0.02
Band density to control (%)	23.4 ± 30.4	44.0 ± 51.8	0.04

*mean ± S.D.

다변량분석(multivariate analysis)을 각각 시행하여 IC₅₀이 사망 및 재발에 미치는 영향을 구하였고, 유의성은 p값이 0.05 이하인 경우로 정하였다.

결 과

1) 정상조직과 암조직에서 IC₅₀ 비교

각 검체에서 MMP-9의 발현량은 (percent band density to control)은 암조직에서 정상조직보다 증가하였다(p=0.04). 그리고 정상조직에 비해 암조직에서의 IC₅₀이 높게 관찰되었다(p=0.02)(Table 2).

2) 임상인자별 정상조직과 암조직의 IC₅₀ 비교

종양의 크기가 큰 경우(≥5 cm)(p=0.03), T-병기와(p=0.04), 병리학적 병기가 진행된 경우(p=0.04) 정상조직에서보다 암조직에서 IC₅₀이 높았다. 림프절 전이가 없는 경우에는 정상조직과 암조직 사이에 IC₅₀의 유의한 차이가 없었으나, 전이가 발생한 환자에서는 정상조직보다 암조직에서 IC₅₀가 높았다(p=0.04)(Table 3).

3) 조직학적 유형과 침습 정도에 따른 정상조직과 암조직의 IC₅₀ 비교

(1) **Lauren's 분류:** Lauren's 분류에 따라서 정상조직과 암조직사이의 IC₅₀을 비교할 경우 intes-

tinal type에서는 유의한 차이가 없었으나, diffuse type과 mixed type을 합한 경우 암조직에서 IC₅₀이 정상조직보다 높았다(p=0.03)(Table 3).

MMP-9의 발현량은 intestinal type에서는 정상과 암조직에서 차이가 없었으나(31.4±38.9% vs 50.9±58.0%), diffuse type과 mixed type을 합한 경우에는 암조직에서 정상조직보다 통계적 유의성을 나타내었다(19.0±24.6% vs 40.3±49.2%; p=0.08).

암조직에서 Lauren's 분류에 따라 MMP-9 발현량과 IC₅₀를 비교시에, MMP-9의 발현량은 차이가 없었던 반면(intestinal: 51.0±58.0%, diffuse & mixed: 40.3±49.2%), IC₅₀은 intestinal type보다 diffuse type과 mixed type을 합한 경우에서 더 높은, 통계적 유의성을 나타내었다(intestinal: 2.7±3.9 mg/ml, diffuse & mixed: 11.0±20.8 mg/ml; p=0.07).

(2) **침습정도:** 암이 점막과 점막하층에 국한된 경우는 정상과 암조직에서 IC₅₀의 차이가 없었으나, 점막하층을 넘어간 경우는 정상보다 암조직에서 IC₅₀이 높았다(p=0.02)(Table 3). 암이 점막과 점막하층에 국한된 경우와 점막하층을 넘어간 경우에서 암조직의 IC₅₀를 비교시에 점막하층을 넘어간 경우에서 점막층에 국한된 경우에 비해 IC₅₀가 증가하는 경향이 관찰되었으나 유의성은 없었으며(점막과 점막하층에 국한된 경우: 0.8±0.6 mg/ml, 점막하층을 넘어간 경우: 9.5±18.7 mg/ml), 두 경우

Table 3. Comparison of IC₅₀ between normal and cancer tissues based on clinical parameters

		Normal*	Cancer*	p-value
Size	<5 cm (n=8)	0.9±1.1	4.7±9.4	0.15
	≥5 cm (n=26)	0.7±0.8	9.3±19.3	0.03
Depth of invasion [†]	m+sm (Tis-T1) (n=5)	0.9±0.9	0.8±0.6	0.92
	pm-si (T2-T4) (n=29)	0.8±0.9	9.5±18.7	0.02
N factor	Negative (n=9)	0.6±0.8	5.9±13.2	0.14
	Positive (n=25)	0.8±0.9	9.1±18.9	0.04
Stage	I~II (n=8)	0.7±0.9	6.0±14.1	0.33
	III~IV (n=26)	0.8±0.9	8.9±18.6	0.04
Lauren's classification	Intestinal (n=12)	1.2±1.0	2.7±3.9	0.27
	Diffuse & Mixed (n=22)	0.6±0.7	11.0±20.8	0.03

*mean (mg/ml)±S.D.

[†]m: mucosa, sm: submucosa, pm: proper muscle, si: serosa invasion

에 있어서 암조직의 MMP-9 발현량에는 차이가 없었다(점막과 점막하층에 국한된 경우: 44.5±75.2%, 점막하층을 넘어간 경우: 44.0±48.5%).

4) 각 임상인자에 따른 'high IC₅₀'군의 발현 빈도

Stage, N factor, T factor, size와 같은 임상인자들에 따라 'high IC₅₀' 발현빈도를 조사한 바, 종양이 큰 경우(5 cm 이상, 34.6% vs 5 cm 이하, 12.5%, p=0.34), 병기가 진행한 경우(병기 I과 II 12.5% vs 병기 III과 IV 34.6%, p=0.39)에서 'high IC₅₀'의 발현 빈도가 증가하는 경향은 관찰되었으나 유의성은 없었다.

5) IC₅₀에 따른 생존율 비교

전체 환자에서 IC₅₀이 낮은 군의 12개월, 48개월 전체생존율은 각각 79%, 29%였고, IC₅₀이 높은 군은 63%, 13%였다(Fig. 2). 근치적 수술을 받은 환자에서 IC₅₀이 낮은 군의 12개월, 48개월 전체생존율은 각각 100%, 47%였고, 무병생존율은 각각 75%, 38%였다. IC₅₀이 높은 군의 12개월, 48개월 전체생존율은 각각 100%, 20%였으며, 무병생존율은 각각 60%, 20%로(Fig. 3), 근치적 수술을 한 환자에서 IC₅₀이 낮은 군이 높은 군에 비해 전체 생존율이 증가하였다(p=0.04). 고식적 수술을 받은 12예에서 IC₅₀이 낮은 군의 6개월, 18개월 전체생

존율은 각각 71%, 29%였으며, IC₅₀이 높은 군의 6개월 전체생존율은 33%였다(p=0.43).

6) 사망위험도 및 재발위험도의 다변수분석

전체환자에서 단변수분석시에 T (p=0.02), N인자(p=0.02), 병기(p=0.01) 및 근치적 수술여부(p=0.0001)가 생존율에 대한 예후인자로 관찰되었으며, 근치적 수술이 시행되었던 환자에서 병기(p=0.02)와 N인자(p=0.02)가 재발에 대한 예후인자로 관찰되었다(Table 4). T와 N 인자가 병기와의 상관성이 높아, 이를 보정하고 다변수 분석시에 IC₅₀ (p=0.02), 성별(p=0.01), 병기(p=0.03) 및 근치

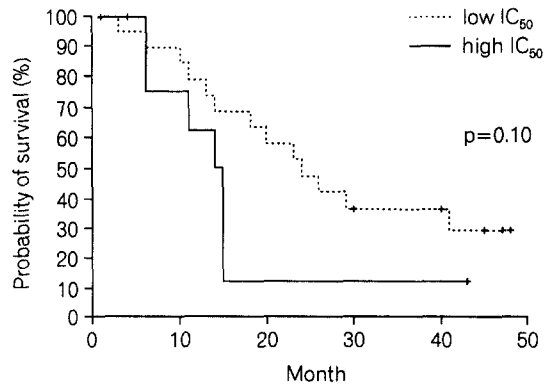


Fig. 2. Comparison of overall survival based on IC₅₀ in total patient

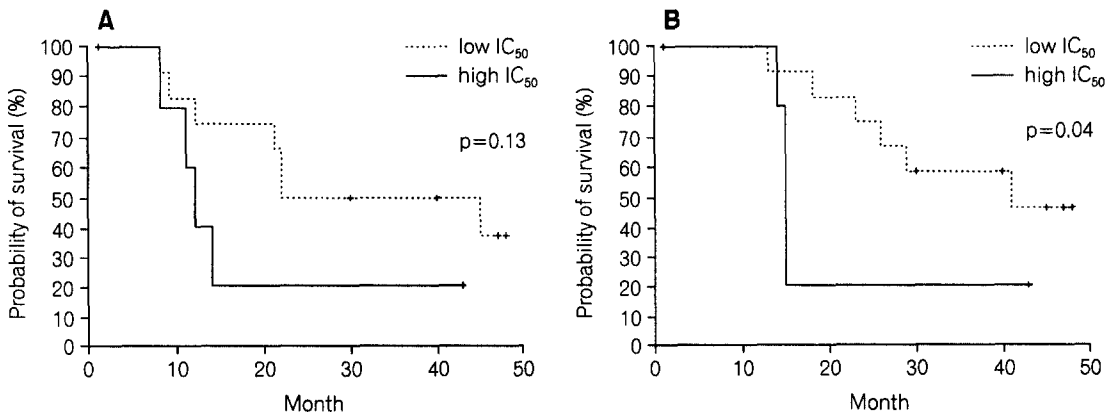


Fig. 3. Comparison of survival based on IC₅₀ in curatively resected patients. A. Disease-free survival, B. Overall survival.

Table 4. Univariate analysis of overall survival by Cox's proportional hazards model

Variables	All patients (n=34)		Curatively resected patients (n=22)		Palliatively resected patients (n=12)	
	Risk ratio	p-value	Risk ratio	p-value	Risk ratio	p-value
IC ₅₀ (low : high)	1.81	0.21	1.89	0.33	2.40	0.26
Sex (F : M)	3.35	0.06	2.57	0.23	3.00	0.31
Age						
26~45	1.00		1.00		1.00	
46~65	2.00	0.22	1.00	1.00	3.80	0.21
66~84	0.38	0.25	0.35	0.23	*	
Stage (I+II : III+IV)	12.61	0.01	9.94	0.03	†	
N factor (negative : positive)	6.05	0.02	9.94	0.03	0.32	0.32
Size (<5 cm : ≥5 cm)	2.60	0.13	4.50	0.15	1.82	0.46
Depth of invasion †	4.93	0.12	31.63	0.27	1.13	0.92
(m+sm [Tis+T1] : pm-si [T2-T4])						
Serosa invasion (negative : positive)	2.23	0.09	0.99	0.99	2.27	0.23
Lauren's classification § (I : D+M)	1.33	0.56	2.08	0.35	1.29	0.70
Borrmann type (1+2 : 3+4)	0.92	0.86	1.07	0.92	1.13	0.85
Operation † (c : p)	4.12	0.0001				

*None of patients is between 68 and 84 years old.

†All patients are of stage III or IV

‡m: mucosa, sm: submucosa, pm: proper muscle, ss: subserosa, se: serosa, si: serosa invasion

§I: intestinal, D: diffuse, M: mixed

†c: curative, p: palliative

Table 5. Multivariate analysis of overall survival by Cox's proportional hazards model

Variables	All patients (n=34)		Curatively resected patients (n=22)		Palliatively resected patients (n=12)	
	Risk ratio	p-value	Risk ratio	p-value	Risk ratio	p-value
IC ₅₀ (low : high)	3.69	0.02	4.01	0.12	1.87	0.47
Sex (F : M)	7.62	0.01	16.81	0.04	6.76	0.17
Stage (I+II : III+IV)	11.39	0.03	24.75	0.02	§	§
Size (<5 cm : ≥5 cm)	1.57	0.60	0.51	0.68	4.20	0.32
Depth of invasion*	0.85	0.90	—	—	0.29	0.46
(m+sm : pm+ss+se+si)						
Lauren's classification † (I : D+M)	1.14	0.85	0.38	0.36	1.36	0.78
Operation † (c : p)	4.36	0.01				

*m: mucosa, sm: submucosa, pm: proper muscle, ss: subserosa, se: serosa, si: serosa invasion

†I: intestinal, D: diffuse, M: mixed

‡c: curative, p: palliative

§All patients are of stage III or IV.

Table 6. Multivariate analysis of disease-free survival in curatively resected patients by Cox's proportional hazards model

Variables	Risk ratio	p-value
IC ₅₀ (low : high)	3.60	0.15
Sex (F : M)	3.70	0.23
Stage (I+II : III+IV)	8.70	0.09
Size (<5 cm : ≥5 cm)	0.98	0.99
Lauren's classification* (I : D+M)	0.50	0.52

*I: intestinal, D: diffuse, M: mixed

적 수술여부(p=0.01)가 독립적 예후인자로 관찰되었다(Table 5). 근치적수술이 시행되었던 환자에서는 병기가 예후인자(p=0.02)였으며, 고식적수술을 시행받은 환자에서는 특별한 인자가 관찰되지 않았다(Table 5). 근치적 수술이 시행되었던 환자에서 재발위험도와는 병기(p=0.09)가 가장 관계있었다(Table 6).

고 찰

암의 침윤과 전이는 암의 증식 및 침윤, 혈행이동, 암세포부착 및 기저막 용해, 암세포의 이동, 증식, 중앙신생혈관 형성유도 등의 단계적 과정이 연속적으로 발생하면서 일어나는 현상이다(11). 암의 단계적인 전이과정 동안 암세포는 증식을 위해 성장인자를 생성하고(12), 단백질분해효소를 생성분비하며(13,14) 암세포의 부착 및 이동능과 중앙 신생혈관 형성능 등 여러 가지 생물학적 특성을 나타낸다. 이러한 생물학적 특성은 암의 진행과정 중 서로 발현하는 시기가 달라 동일한 해부학적 병기에서도 생물학적 특성의 차이에 따른 세부병기 설정에 대한 개념이 제시되고 있다(15~17).

정상조직 및 혈관내피세포의 기저막은 암세포 전이의 기계적 장벽 역할을 한다. 간상형의 triple-helical 구조로 된 collagen은 세포의 기질의 구성 성분이며 그중 하나인 type IV collagen이 기저막의 주성분이 된다(18). 타조직에 대한 침윤은 태반의

착상, 태아발생시의 장기형성, 감염부위로의 백혈구 집합 등 체내에서 생리적인 과정에서도 볼 수 있는 것이지만, 병리 소견상 기저막의 파괴는 암 조직의 침윤능을 대변하는 중요한 표지자이다. 유방암, 대장암, 위암, 갑상선암, 폐암, 간세포암, 두경부암, 전립선암, 난소암, 악성흑색세포종(18) 등에서 침윤과 전이 정도와 MMPs 발현과의 상관성은 확인되었다. 위암에서 혈청내 proMMP-2 (72 kD) 및 proMMP-9 (92 kD)은 종양태아 항원과 독립적인 종양표지자로서 제시되었으며(19), 장막이상 침윤이 발생한 위암에서 점막에 국한된 위암보다 matrilysin (MMP-7)의 발현율이 증가하였다(20). 면역조직화학적 염색에 의한 MMP-2의 발현은 위암의 예후와 상관성이 관찰되었으며, 특히 미만성 위암에서 중요한 예후인자로 제시되었다(21). MMP-2의 발현과 Lauren's classification, M-병기 사이에는 유의한 상관관계가 관찰되었고, 비활성형 MMP-9, MMP-2는 암조직으로부터 멀리 떨어진 정상조직에서도 발현되었다. 특히 비활성형 MMP-9는 중성구나 대식세포 등 혈구세포에서도 발현되었다(22). 활성형 MMP-2는 암조직으로부터 10 cm 떨어진 정상 조직에서는 발현되지 않았으나 Borrmann type 4에서는 일부 약하게 발현됨이 관찰되며(22), 이는 육안적으로는 정상이나 암 세포가 침윤되어 있을 가능성이 높아 보다 연구가 필요한 사항이다. 위암에서 MMP-9와 MMP-2의 발현유형을 조사한 바에 따르면 원발병소에서 MMP-9와 MMP-2의 활성도가 증가할수록, 혹은 동시에 두 가지 MMPs가 발현될수록 영역 림프절로의 전이가 증가하였다. 이와같이 MMPs의 생성 및 활성물은 위암의 침윤과 전이에 관계가 깊으므로, 이들이 위암의 침윤과 전이를 억제시킬 수 있는 생물학적 치료의 목표가 될 가능성이 임상적으로 제시되었다(9).

MMPs의 *in vitro* 실험은 주로 immunohistochemical staining, *in situ* hybridization 등이 많이 쓰였으나 활성형과 비활성형을 구분할 수 없다는 단점이 있었다. 반정량적으로 활성도를 분석하면서 활성형과 비활성형을 구분할 수 있는 방법으로

gelatin zymography가 널리 사용되고 있어(23), 본 연구에서는 zymography 방법을 이용하여 *ex vivo* model에서 Foy에 대한 IC₅₀을 비교함으로써 MMPs의 억제 가능성 및 치료대상 선정 가능성을 조사하였다. Foy는 trypsin, kallikrein, plasmin, alpha2-macroglobulin, thrombin, phospholipase A2, Cl esterase 등에 억제 효과를 나타낸다(24). Serine proteinase inhibitor 계열인 Foy는 항암제는 아니지만, 임상적으로 널리 사용되고 있을 뿐만 아니라 비펩타이드성으로서 항원성이 적어 부작용이 거의 없는 약물로 알려져 있다. 저자들은 예비실험에서 MMP-9, MMP-2의 활성형 및 비활성형 모두에 대한 억제 효과를 나타내어 MMPs 억제제로서 본 실험에 사용하였다. 기존의 MMPs의 발현과 암의 진행 정도 및 침습성을 비교한 연구결과들은 전체적인 예후와 MMPs 발현과의 상관성을 조사한 것이며(25), 개개인의 환자에서 이들의 발현이 갖는 의미에 대한 연구결과나 각각의 환자에 임상적으로 MMPs의 발현을 어떻게 적용하는가에 대한 조사는 없다. 따라서 MMP-9은 그 정도는 다르지만 대부분의 위암조직에서 발현되므로 이를 억제하는 농도를 거의 모든 환자에서 정량적으로 나타낼 수 있을 것이며, 이의 절대치가 기타 위암의 예후인자들과 상관관계를 나타낸다면, 각 환자를 평가하는데 실제적으로 쓰일 수 있다는 점을 착안하여 본 연구를 시행하였다. 특히 단백분해효소 억제제의 IC₅₀이라는 개념을 MMPs 발현 및 활동도의 간접 측정에 도입하여 위암환자의 예후를 평가하고자 암조직만의 IC₅₀을 비교하는 것보다는 각 개개인의 환자에서 정상조직의 MMP-9에 대한 IC₅₀와의 비교도 시행하였다.

환자로부터 얻어진 모든 암 조직표본에서 MMP-9 (92 kD)이 발현되었으며, 발현량이 클수록 IC₅₀이 커서, 암조직의 평균 IC₅₀이 정상보다 높았다($p=0.02$). 정상조직 IC₅₀의 '평균+2×표준편차' 이상의 값을 high IC₅₀로 설정하여 기존의 임상적 parameter들과 IC₅₀과의 상관관계를 분석한 바, 암 종괴의 크기가 작고 TNM 병기가 낮은 경우에는 정상 및 암조직의 IC₅₀ 차이가 없는데 반하여, 종

괴의 크기가 크고 TNM 병기가 높은 경우 양자간 IC₅₀의 차이가 심하였다. 이는 정상조직의 IC₅₀은 암의 진행여부에 상관없이 대부분 비슷한 값을 나타내는데 반하여 진행성 위암일수록 암조직의 IC₅₀ 절대치가 높았기 때문인 것으로 판단된다. 그러나 임상적 예후가 비교적 좋은 세부 군에서 중앙조직의 IC₅₀가 정상조직의 IC₅₀보다 3배 이상 증가되었음에도 개인차가 심하여 표준편차가 2배 이상 차이가 있는 점, 대상 환자수가 작다는 점은 추후 고려해야 할 사항으로 생각되었다. 즉 침윤과 전이가 일어난 진행성 위암에서 MMP-9이 과발현되었음을 뜻하므로 보다 많은 표본을 대상으로 암조직의 IC₅₀을 조사하여 정규분포 곡선을 얻는다면, 정상조직과의 비교가 아닌 암조직 단독의 IC₅₀ 절대치로 예후를 가능해볼 수 있다는 가능성을 제시할 수 있었다. 암의 침습성과 관련한 MMPs의 역할을 고려하여 암의 침습깊이에 따라 분석한 결과, 암이 점막과 점막하층에 국한된 경우는 정상과 암조직에서 IC₅₀이 차이가 없었으나, 점막하층을 넘어간 때에는 정상보다 암조직에서 IC₅₀이 유의하게 높았다($p=0.02$). 특이한 점은 암조직의 IC₅₀은 점막하층을 넘어간 경우가 점막에 국한된 경우에 비하여 뚜렷하게 높은 경향을 보였으나(점막과 점막하층에 국한된 경우: 2.5 ± 3.8 mg/ml, 점막하층을 넘어간 경우: 11.0 ± 20.8 mg/ml), 암조직 MMP-9의 발현량은 차이가 없었다(점막과 점막하층에 국한된 경우: $44.5 \pm 75.2\%$, 점막하층을 넘어간 경우: $44.0 \pm 48.5\%$). Lauren's classification에 의한 비교에서도 intestinal type은 IC₅₀이 작은 반면, diffuse와 mixed type을 합한 경우 증가하였다($p=0.07$). 이 경우에서도 두 군에서 MMP-9의 발현량은 차이가 없었다(intestinal: $51.0 \pm 58.0\%$, diffuse와 mixed type: $49.2 \pm 50.2\%$). 암의 침습깊이에 따른 분석과 Lauren's classification에 따른 분석의 결과를 종합하면, 암조직의 IC₅₀이 비침윤성암에서보다 침윤성암에서 더 크게 나타나는 이유는 MMP-9 자체의 성향이 다르거나 미세환경이 다르기 때문으로 생각되어 추후 이를 확인하고자 한다. 아울러 다른 종류의 MMPs 역시 과발현되며

그들의 IC₅₀가 침윤성 암에서보다 더 높은지의 여부는 더 많은 예수의 표본을 이용한 실험이 필요할 것이다. 이와같은 결과에서 단순한 MMPs 발현외에도 MMPs에 대한 IC₅₀가 하나의 중요한 생물학적 표지자로 이용할 수 있는 가능성을 확인할 수 있었다.

환자의 예수가 많지는 않지만 IC₅₀가 높은 경우에서 환자의 예후가 불량하였으며, 특히 근치적 절제가 시행된 환자에서 IC₅₀이 높은 경우 예후가 불량한 점, 모든 예후인자를 사용하여 다변수 분석시에 IC₅₀가 독립적 인자로 관찰된 점 등은 IC₅₀의 임상적 응용 가능성을 확인할 수 있었다. Foy 자체를 위암의 보조치료제로 사용할 수 있는지는 아직 결론을 내릴 수는 없었다. 이는 임의로 표본 및 약물 농도를 정하여 *ex vivo* model에서 얻은 IC₅₀을 therapeutic range와 비교하기는 어렵기 때문이다. 그러나 Foy의 IC₅₀ screening으로 낮은 IC₅₀ 값을 갖는 암(특히 병리학적 병기가 높은 암에서) 환자의 경우, Foy 또는 유사제열의 단백질해효소 억제제로 보조치료하여 나은 치료성적을 거둘 수 있는 가능성을 고려할 수 있다 하겠다. 최근 항암치료의 new target의 하나로 matrix가 꼽히고 있으며, MMP inhibitors (MMPI)가 치료제로 응용되고 있으므로(6), 이들을 사용하는 대상 환자를 선정하는 기준으로 본 연구결과를 응용할 수 있다고 생각된다. 따라서 이와같은 임상연구를 진행하는 과정에서 본 연구 모델을 이용하여 치료대상이 되는 환자를 정확하게 선정하여 임상연구를 시행함으로써 약효를 보다 정확하고 신속하게 평가할 수 있을 것으로 기대된다.

결 론

위암에서 MMP-9에 대한 gabexate mesylate IC₅₀를 *ex vivo* model을 이용하여 측정하였으며, 이를 이용하여 예후가 불량한 환자를 구분할 뿐 아니라, 독립적 예후인자로 사용할 수 있는 가능성을 제시하였다. 이같은 개념은 추후 MMPs 억제제의 임상 사용시에 적합한 대상이 되는 환자를 선택

하는 방법으로 사용함으로써 치료의 효율을 증가시키고, 신약개발 임상시험의 정확성과 신속성을 증가시킬 수 있을 것으로 기대된다.

참 고 문 헌

1. Talbot DC, Brown PD. Experimental & clinical studies on the use of MMPis for the treatment of cancer. Eur J Cancer 1996;32A:2528-2533.
2. Brown PD. Matrix metalloproteinase inhibitors. Breast Cancer Res Treat 1998;52:125-136.
3. Moses MA. The regulation of neovascularization by matrix metalloproteinases & their inhibitors. Stem Cells 1997;15:180-189.
4. Chamber AF, Matrisian LM. Changing views of the role of matrixmetalloproteinases in metastasis. J Natl Cancer Inst 1997;89:1279-1295.
5. Beattie GJ, Smyth JF. Phase I study of intraperitoneal metalloproteinase inhibitor BB94 in patients with malignant ascites. Clin Cancer Res 1998;4:1899-1902.
6. Chung HC, Rha SY, Park JO, Ahn JB, Lee CI, Yoo NC, Roh JK, Noh SH, Min JS, Kim BS, Lim HY, Choi JH. Expression of matrixmetalloproteinases in gastric cancer as new targets for biotherapy. J Korean Cancer Assoc 1995;27:897-906.
7. Grigioni WF, D'Errico A, Fortunato C, Fiorentino M, Mancini AM, Stetler-Stevenson WG, Sobel ME, Liotta LA, Onisto M, Garbisa S. Prognosis of gastric carcinoma revealed by interactions between tumor cells & basement membrane. Modern Pathol 1994;7: 220-226.
8. Colasanti M, Persichini T, Venturini G, Menegatti E, Lauro GM, Ascenzi P. Effect of Gabexate mesylate, a drug for serine proteinase-mediated diseases, on the nitric oxide pathway. Biochem Biophys Res Comm 1998;246:453-456.
9. Sundbeck A, Myrhyge R, Peterson HI. Influence of tranexamic acid on tumor vascularization. an experimental microangiographic study. Anticancer Res 1981;1:295-298
10. Birkedal-Hansen H, Taylor RE. Detergent-activation of latent collagenase and resolution of its component molecules. Biochem Biophys Res Comm 1982;107: 1173-1178.
11. Liota LA, Steeg P, Stetler-Stevenson W. Cancer metastasis and angiogenesis: an imbalance of positive and negative regulation. Cell 1991;64:327-336.

12. Sporn MD, Todaro GJ. Autocrine growth factors and cancer. *Nature* 1985;313:747-751.
13. Andreason PA, Georg B, Lund LR, Riccio A, Stacey SN. Plasminogen activator inhibitors: hormonally regulated serpins. *Mol Cell Endocrinol* 1990;68:1-19.
14. Noh SH, Lee CI, Chung HC, Park JO, Rha SY, Yoo NC, Roh JK, Min JS, Kim BS, Lee KB. Expression and clinical relevance of collagen IV and type IV collagenase in gastric cancer. *J Korean Diges* 1996; 28:1-10.
15. Lee KS, Rha SY, Kim SJ, Roh JK, Kim BS, Chung HC. Sequential activation & progression of MMP-2 during breast cancer progression. *Clin Exp Metastasis* 1996;14:512-519.
16. Lydiatt WM, Schantz SP. Biological staging of head & neck cancer & its role in developing effective treatment strategies. *Cancer Metastasis Rev* 1996;115: 11-25.
17. Rha SY, Chung HC, Gong SJ, Chung HC, Roh JK, Min JS, Kim BS. Anti-tumor effects of growth factor inhibitors and anti-metastatic agents in human gastric cancer cell lines. *J Korean Cancer Assoc* 1996;29:159-185.
18. Liotta LA. Cancer cell invasion and metastasis. *Scientific American* 1992;275:54-64.
19. Endo K, Maehara Y, Baba H, Yamamoto M, Tomisaki S, Watanabe A, Kakeji Y, Sugimachi K. Elevated levels of serum and plasma matrix metalloproteinases in patients with gastric cancer. *Anticancer Res* 1997; 17:2253-2258.
20. Senota A, Itoh F, Yamamoto M, Adachi Y, Hinoda Y, Imai K. Relation of matrilysin mRNA expression with invasive activity in human gastric cancer. *Clin Exp Metastasis* 1998;16:313-321.
21. Allgayer H, Babic R, Beyer BC, Grutzner KU, Tarabichi A, Schildberg FW, Heiss MM. Prognostic relevance of MMP-2 in gastric cancer. *Oncology* 1998;55:152-160.
22. Yamagata S, Yoshii Y, Suh JG, Tanaka R, Shimizu S. Occurrence of an active form of gelatinase in human gastric and colorectal carcinoma tissue. *Cancer Letters* 1991;59:51-55.
23. Nomura H, Sato H, Seiki M, Masayoshi M, Okada Y. Expression of membrane-type matrix metalloproteinase in human gastric carcinomas. *Cancer Res* 1995;17: 3263-3266.
24. Cavallini G, Tittobello A, Frulloni L, Masci E, Mariana A, DiFrancesco V. Gabexate for the prevention of pancreatic damage related to ERCP. *New Engl J Med* 1996;26:919-925.
25. Iizasa T, Fujisawa T, Suzuki M, Motohashi S, Yasufuku K, Yasukawa T, Baba M, Shiba M. Elevated levels of circulating plasma MMP-9 in non-small cell lung cancer patients. *Clin Cancer Res* 1999;5:149-153.