

유방암에서 Matrix-metalloproteinase-9(MMP-9)의 발현

연세대학교 의과대학 암센터, 암연구소, 내과학교실 및 외과학교실

라선영 · 김세중 · 정현철 · 김주항
노재경 · 이경식 · 김병수

=Abstract=

Expression of Matrix-metalloproteinase-9(MMP-9) in Breast Cancer

Sun Young Rha, M.D., Sea Joong Kim, M.D., Hyun Cheol Chung, M.D.
Joo Hang Kim, M.D., Jae Kyung Roh, M.D., Kyong Sik Lee, M.D.
and Byung Soo Kim, M.D.

Yonsei Cancer Center, Institute for Cancer Research,
Department of Internal Medicine, General Surgery
Yonsei University College of Medicine, Seoul, Korea

The degradation of the basement membrane by matrix-metalloproteinase(MMP) and serine protease is a critical point in tumor invasion and metastasis. We measured the activity of MMP-9 from 28 normal, 12 benign, and 126 breast cancer tissues using gelatin zymography with an image analysis system. Inactive MMP-9 was expressed in 17.5% of the cancer patients compared to 2.5% in 40 non-cancerous tissues($p=0.008$). The active form of MMP-9(82kD) was expressed only in T2-T4 stages. During the early phase of breast cancer (DCIS and T1 stage) progression, only the production of inactive MMP-9 was increased. However, as the cancer grew or invaded skin(T2-T4), or with lymphovascular permeation, both production and activation of MMP-9 were increased. In conclusion, MMP-9 production was the main cause of increased MMP-9 activity during the early phase, while both production and activation were increased in the late phase of breast cancer.

Key Words: Breast cancer, Invasion, Zymography, MMP-9

서 론

유방암은 최근 우리나라 여성에서도 발생이 증가하는 암으로, 약 50%의 환자에서는 전이 혹은 재발에 의해 사망하게 된다. 암세포의 증식, 침윤 및 전이가

*본 연구는 1995년도 연세대학교 의과대학 일반과제(감사) 연구비의 일부보조로 수행되었음.

발생하기 위해서는 그 첫 단계로서 기저막의 파괴가 필수적이다¹⁾. 또한 암세포가 혈관내로 침투하기 위해서는 주로 type IV collagen으로 구성되어 있는 내피세포하층의 기저막을 용해시켜야 한다.

이와같은 단백질 분해 과정에는 matrixmetalloproteinase(MMP), serine계 단백질 분해효소, cathepsin 등이 관여함으로 알려져 있다²⁾. 특히 기저막 분해 과정에는 gelatinase A 혹은 B로 알려지기도 한

MMP-9(분자량 92,000)와 MMP-2(분자량 72,000)가 주된 역할을 담당한다³⁾. 생체내에서 MMP-2는 섬유아세포, 내피세포, 대식세포 등에서 주로 생성되며, MMP-9은 주로 다핵세포, 대식세포 및 각질세포에서 생성된다⁴⁾. 면역조직화학적 염색을 통한 연구에서도 이와 유사한 결과가 관찰되므로, MMP-9은 정상세포와 암세포 모두에서 생성됨으로 보고된다^{5,6)}. 그러나 면역조직화학적 염색에 의한 검사는 단백질해 효소의 활성형과 비활성형을 구별하지 못할 뿐 아니라 정량적 분석이 어렵다는 단점이 있다.

최근 침윤성 암세포의 세포막에서 MMP 활성화 기전이 발견되었으며, 이는 암세포막에서 일어나는 MMP의 활성화가 암세포 침윤에서 중요한 부분임을 제시한다⁷⁾. 특히 zymography라는 방법이 개발되어 MMP의 활성형과 비활성형을 구별할 수 있게 됨에 따라, MMP의 활성 정도와 암의 침윤도와의 상관성에 대한 연구를 보다 정확하게 할 수 있게 되었으며⁸⁾, 컴퓨터를 이용하여 영상을 분석하는 경우 정량적 분석이 가능하게 되었다⁹⁾. 따라서 본 연구에서는 컴퓨터 영상 분석에 의한 zymography를 시행하여 유방암의 진행과정에서 MMP-9의 생성과 활성 정도 및 그 변화를 조사하였다.

대상 및 방법

1) 조직 검체

조직은 수술적 제거후 고정 시키기 전에 추출하여 -70°C 에 냉동 보관하였다. 정상 유방 조직 28명, 양성 종양 조직 12명, 비침윤성 유방암 14명, 침윤성 유방암 112명에서 조직을 채취하였다. 일정시기 마다 조직을 pulverize 시켜 세포질(cytosol)을 만들고 -70°C 에 보관하면서 검사를 시행하였다. 세포질을 만들기 위해 먼저, 조직 100 mg을 분쇄시킨 후 초원심 분리 시험관에서 균질화 용액으로 10배 희석시켰다. 균질화 기기를 사용하여 5초 이내로 조직을 균질화한 다음 4°C 에서 1시간 동안 100,000 g로 원심분리시켰다. 상층부의 세포질을 얼음위에 설치한 시험관내로 옮긴다음 실험에 사용하였다.

2) Marker 세포주 배양

HT-1080 세포주를 37°C 의 0.5% CO_2 세포 배양

Fig. 1. Detection of MMP-9 and MMP-2 activities of marker as shown by zymography, showing captures of band images using computer-assisted image analysis.

기에서 10% 우태아혈청이 함유된 세포배양 배지로 배양하였다.

3) Gelatinase marker

HT-1080 세포주 배양에서 추출한 conditioned media를 92 kD와 82 kD의 표지자로 사용하였다¹⁰⁾.

4) Zymography

Type IV collagen의 기질이 포함된 gel을 사용하여 20 mA에서 전기 영동하여 시행하였다¹¹⁾. 전기영동후 gel은 renaturing buffer로 20°C 에서 30분간 반응시킨 다음, 5분간 developing buffer로 세척하였다. 다시 37°C 의 신선한 developing buffer에서 15시간 반응시키고 Coomassie blue 염색을 시행하였다. Gel을 고정시킨 후 computer-assisted image analyser를 이용하여 분석하였다. 단백질해효소 활성도는 gel의 영상을 capture software에 연결된 video-camera로 촬영한 후 band area를 측정하였다(Fig. 1). MMP-9의 총활성도는 92 kD+82 kD의 합으로, 활성율은 82 kD/(92 kD+82 kD)의 비율로 정하였다.

5) 병리학적 병기

환자의 조직을 포르말린에 고정후, paraffin block을 만들고 H & E 염색을 시행하였다. 병기는 TNM 기준에 의해 정하였다¹²⁾.

Table 1. Expression rate of MMP-9 during breast cancer progression

| | | 92 kD | p-value | 82 kD | p-value |
|----------|---------|------------|---------|------------|---------|
| normal | (n= 28) | 0(0.0%) | | 0(0.0%)** | |
| benign | (n= 12) | 1(8.3%) | | 0(0.0%) | |
| cancer | (n=126) | 22(17.5%)* | 0.008 | 7(5.6%)** | 0.24 |
| DCIS | (n= 14) | 2(14.3%) | | 0(0.0%) | |
| invasive | (n=112) | 20(17.9%) | | 7(6.3%) | |
| T1 | (n= 22) | 3(13.6%) | | 0(0.0%) | |
| T2 | (n= 70) | 11(15.7%) | | 5(7.1%) | |
| T3 | (n= 14) | 4(28.6%) | | 2(14.2%) | |
| T4 | (n= 6) | 2(33.3%) | | 0(0.0%) | |

*, **: comparison between normal and cancer

6) 통계적 분석

각 군간의 비교는 chi-square test, Fisher's exact test 및 Student t-test를 시행하였다.

결 과

1) 유방암의 진행에 따른 MMP-9의 발현율

MMP-9의 발현율을 28명의 정상, 12명의 양성 유방종양, 126명의 유방암 조직에서 조사하였다. 40명의 정상 및 양성종양 조직에서는 단지 1명(8.3%)에서만 MMP-9의 발현이 관찰된 반면, 암조직에서는 22예(17.5%)로 그 발현도가 증가하였다(p=0.008). 활성형의 MMP-9(82 kD)은 암조직에서만 관찰되었다. 유방암의 상태가 ductal carcinoma in situ(DCIS)에서 T4병기로 진행될 수록 MMP-9의 발현율이 증가하는 경향이 관찰되었다. 유방암 조직에서도 활성형(82 kD)은 T2 이상에서만 관찰되었다(Table 1).

2. MMP-9의 발현과 임상 인자들과의 상관성

기존의 알려진 예후 인자들과 MMP-9 발현과의 상관성을 비교하였다. 임파절 전이 유무와 MMP-9의 발현과는 상관성이 관찰되지 않았으며, 병기가 진행할 수록, 호르몬 수용체 양성인 경우에서 발현도가 증가하는 경향을 관찰할 수 있었다(Table 2).

3) MMP-9을 발현한 22예에서 유방암의 진행에 따른 MMP-9 활성도 비교

MMP-9을 발현한 22예에서 MMP-9의 비활성형

Table 2. Comparison of MMP-9 expression incidence based on clinical parameters

| | | 92 kD | 82 kD |
|----------------------------------|---------|-----------|----------|
| Lymph node metastasis | | | |
| negative | (n= 64) | 12(18.8%) | 4(6.3%) |
| positive | (n= 62) | 10(16.1%) | 3(4.8%) |
| Stage | | | |
| I | (n= 19) | 3(15.8%) | 0(0.0%) |
| II | (n= 74) | 13(17.6%) | 5(6.8%) |
| III | (n= 33) | 6(18.2%) | 2(6.1%) |
| Estrogen receptor | | | |
| positive | (n= 47) | 10(21.3%) | 2(4.3%) |
| negative | (n= 76) | 11(14.5%) | 5(6.6%) |
| unknown | (n= 3) | 1(33.3%) | 0(0.0%) |
| Progesterone receptor | | | |
| positive | (n= 62) | 12(19.4%) | 4(6.5%) |
| negative | (n= 61) | 9(14.8%) | 3(4.9%) |
| unknown | (n= 3) | 1(33.3%) | 0(0.0%) |
| Lymphovascular permeation | | | |
| positive | (n= 16) | 3(18.8%) | 2(12.5%) |
| negative | (n=110) | 19(17.3%) | 5(4.5%) |

(92 kD)과 활성형(82 kD) 각각의 활성도 변화와 활성율을 비교하였다. DCIS와 T1 병기에서는 정상 혹은 양성 종양조직에 비해 비활성형의 92 kD만이 그 활성도가 증가하였다. 그러나 DCIS와 T1 사이에는 92 kD 활성도의 차이가 없었다. 종양이 진행하여 크기가 커지거나 피부 침윤이 발생하는 경우(T2-T4), MMP-

Table 3. Changes of MMP-9 activities and activation rates during breast cancer progression in 22 patients

| | | 92 kD | 82 kD | 92 kD+82 kD | 82/(92+82)ratio |
|----------|--------|---------------|---------------|----------------|-----------------|
| normal | (n=28) | 0 | 0 | 0 | 0 |
| benign | (n= 1) | 479 | 0 | 479 | 0 |
| cancer | (n=22) | 687.8±392.7 | 207.7±415.4 | 895.5±663.6 | 14.1±22.2 |
| DCIS | (n= 2) | 359.5±112.4 | 0 | 359.5±112.4 | 0* |
| invasive | (n=20) | 720.6±80 | 228.5±430.9 | 949.1±672.8 | 15.5±22.8* |
| T1 | (n= 4) | 361.0±890** | 0** | 361.0±80** | 0** |
| T2~4 | (n=18) | 760.4±398.3** | 253.8±448.0** | 1014.2±678.7** | 17.2±23.5** |

* : comparison between DCIS and invasive cancer, $p=0.007$,** : comparison between T1 and T2~4, $p=0.001$, $p=0.03$, $p=0.001$, $p=0.006$ respectively**Table 4.** Comparison of MMP-9 activities and activation rates based on clinical parameters in 22 patients

| | | 92 kD | 82 kD | 92 kD+82 kD | 82/(92+82) ratio |
|---------------------------|--------|-------------|-------------|---------------|------------------|
| Lymph node metastasis | | | | | |
| negative | (n=12) | 624.8±380.3 | 157.7±242.2 | 782.3±522.6 | 12.4±19.5 |
| positive | (n=10) | 763.3±414.0 | 267.9±568.8 | 1031.2±809.9 | 16.1±26.0 |
| Stage | | | | | |
| I | (n= 3) | 324.0± 38.2 | 0 | 324.0± 38.2 | 0 |
| II | (n=13) | 762.2±386.6 | 207.6±294.0 | 969.8±509.1 | 15.4±21.5 |
| III | (n= 6) | 708.5±440.6 | 311.7±691.6 | 1020.2±998.9 | 18.4±28.5 |
| Estrogen receptor | | | | | |
| positive | (n= 8) | 685.0±414.1 | 334.9±624.7 | 1019.0±910.4 | 20.1±25.6 |
| negative | (n=13) | 716.0±398.8 | 145.4±236.0 | 861.4±500.0 | 11.5±18.9 |
| unknown | (n= 1) | 343 | 0 | 343 | 0 |
| Progesterone receptor | | | | | |
| positive | (n=10) | 622.2±381.5 | 252.1±554.1 | 874.3±825.0 | 15.8±25.6 |
| negative | (n=11) | 778.7±409.3 | 186.2±281.5 | 964.9±525.1 | 13.8±20.5 |
| unknown | (n= 1) | 343 | 0 | 434 | 0 |
| Lymphovascular permeation | | | | | |
| positive | (n= 3) | 632.3±553.5 | 623.3±951.1 | 1255.7±1471.9 | 36.7±31.9* |
| negative | (n=19) | 696.5±381.1 | 142.1±259.7 | 838.6±497.9 | 10.5±19.0* |

* : $p=0.6$

9의 총 활성도(92 kD+82 kD) 뿐 아니라 MMP-9의 활성율(82 kD/92 kD+82 kD)도 증가하여 암조직내의 비활성형과 활성형의 활성도가 모두 증가하였다(Table 3).

4) MMP-9의 활성도와 임상인자들과의 상관성

22예의 환자에서 MMP-9의 비활성형과 활성형의 활성도 및 MMP-9의 활성율과 임상 인자들과의 상관

성을 비교하였다. 임파절 전이 유무는 MMP-9의 활성도 및 활성율과는 무관하였다. 발현도와 마찬가지로 병기가 진행하거나 호르몬 수용체가 양성인 경우 MMP-9의 발현율이 증가하는 경향이 관찰되었다. 예수가 많지는 않으나 lymphovascular permeation이 관찰되는 경우 MMP-9의 활성도가 증가하였다(Table 4).

고 찰

기저막은 type IV collagen, laminin, heparan sulfate proteoglycan, fibronectin, nidogen 등으로 구성되어 있으며, 각 조직간의 경계막 역할을 하고 있다. Matrix-metalloproteinase(MMP)는 단백 분해효소로서 암의 침윤과 전이 과정에서 기저막의 용해과정에 주로 작용한다. MMP중 type IV collagenase에는 분자량에 따라 92 kD인 MMP-9과 72 kD인 MMP-2의 두 가지가 있으며, 이들 모두 type IV collagen을 용해시킨다¹²⁾. Type IV collagenase는 비활성형인 zymogen의 형태로 생성 및 분비되며 단백 분해를 갖기 위해서는 이 pro-collagenase가 활성화 되어야 한다¹³⁾. 그러나 생체내에서 이 활성화 기전은 아직 밝혀져 있지 않으며, 최근 암세포 세포막에서 발생하는 활성화 기전이 보고 되었다⁷⁾.

최근까지 면역 조직화학적 염색법이나, in situ hybridization 기법을 이용하여 유방암⁶⁾, 대장암¹⁴⁾, 위암¹⁵⁾ 등에서 MMP의 발현과 암의 침윤도와와의 상관성을 규명하려는 연구가 지속되었다. 그러나 이들 두 가지 연구방법은 공통적으로 비활성형과 활성형을 구분하지 못하는 단점이 있어서 MMP 발현과 암의 침윤과의 상관성에 대한 일관적인 연구결과를 얻지 못하였다. 최근들어 MMP의 활성형과 비활성형을 구별할 뿐 아니라 활성도까지 측정할 수 있는 zymography 방법이 개발되면서, 유방암^{16,17)}, 폐암¹⁸⁾, 뇌암¹⁹⁾ 등에서 MMP 활성도와 암 진행도와의 상관성이 제시되기 시작하였다.

MMP도 원발병소에 따라 서로 다른형의 MMP가 발현할 것으로 생각된다. 즉 폐조직은 정상 혹은 암조직 모두에서 주로 92 kD의 MMP-9을 발현하며, 암조직의 36%에서 활성형인 82 kD가 관찰되었다¹⁸⁾. 반면, 방광암²⁰⁾, 유방암^{16,17)}에서는 주로 MMP-2가 관찰되었다. 본 연구에서도 정상조직과 양성종양 조직에서는 92 kD의 MMP-9 발현도는 매우 낮았다. 그러나 MMP-9의 발현도는 DCIS에서 T4병기로 암이 진행될 수록 증가하여, MMP-9은 유방암의 초기에 발현하기 시작하는 것으로 생각된다(Table 1). 그러나 그 발현율은 비교적 낮은 17.5%였다. 기저막의 용해과정에 실제 작용하는 MMP-9의 활성형인 82 kD는 T2

병기에서부터 관찰된 바, MMP-9의 활성화 과정은 MMP-9의 생성과정 보다는 암 진행의 후기에 나타나는 과정으로 생각된다. 이러한 결과는 MMP-9이 유방암의 기저막 용해 과정에서 주된 인자는 아님으로 생각할 수 있다. 그러나 일단 MMP-9이 발현되는 경우에는 암의 진행에 따라 생성 및 활성화 순서로 발생함이 관찰되었다.

MMP-9이 발현된 22예에서도 저자들은 MMP-9의 발현뿐 아니라 활성도와 활성율 역시 유방암의 진행에 따라 변환함을 관찰하였다. DCIS와 T1 병기 사이에는 92 kD 비활성형의 활성도에는 차이가 없었다. 이는 암이 생성되면서 92 kD의 생성이 증가되었으며 이 증가된 생성은 T1 병기에서도 계속됨을 의미한다 하겠다. 그러나 이 두 병기 모두에서 활성형인 82 kD는 관찰되지 않아, 기저막 용해 첫단계에는 MMP-9이 관여하지 않음을 알 수 있었다. 유방암이 T1 병기에서 보다 진행되기 시작하면서 관찰된 MMP-9의 총 활성도와 활성율이 증가하기 시작하였다. 즉 이 과정에서는 MMP-9의 활성형이 나타나므로 실제 MMP-9이 기저막 용해에 관여하기 시작하는 시기로 생각된다. 특히 MMP-9의 활성물은 lymphovascular permeation이 관찰되는 경우에 증가한 점으로 미루어 MMP-9은 내피세포 하층의 기저막 용해에 관여하여 혈관내로 암세포의 전이에 주로 작용할 것으로 생각된다.

병기가 진행할 수록 MMP-9의 발현도, 발현율, 활성율은 증가하는 경향이었으며, 임파절 전이 유무와 이들과는 상관성이 관찰되지 않았다. 또한 호르몬 수용체가 양성인 경우에 MMP-9의 발현이 증가하는 경향이 관찰되었으나 아직 이들 임상적 예후인자와의 상관성을 관찰할 수 없었다.

결 론

MMP-9은 주로 유방암 조직에서 관찰되었으며, 정상 혹은 양성종양 조직에서는 거의 관찰되지 않았다. MMP-9은 DCIS에서 침윤성 유방암으로 이행하는 기저막 용해에는 작용하지 않으나, 암세포의 혈액내 전이에 필요한 내피세포하층 기저막 용해에는 관여함으로 관찰되었다. 특히 유방암이 진행되는 과정에서 초기에는 MMP-9의 생성이 증가하며 후기에는 생성

과 더불어 활성화가 증가함으로 관찰되었다. 따라서 암의 진행에 따른 이러한 생물학적 특성의 변화는 같은 병기내에서도 특성에 따른 서로 다른 생물학적 치료(stage-oriented biological treatment)의 가능성을 제시한다 하겠다.

참 고 문 헌

- 1) Moscatelli D and Rifkin DB: *Membrane and matrix localization of proteases: a common theme in tumor cell invasion and angiogenesis. Biochem Biophys Acta* **948**: 67, 1988
- 2) Tryggvason K, Hoyhtya M, Pyke C: *Type IV collagenases in invasive tumors. Breast Cancer Res Treat* **24**: 209, 1993
- 3) Stetler-Stevenson WG: *Type IV collagenases in tumor invasion and metastasis. Cancer Metast Rev* **9**: 289, 1990
- 4) Wilhelm SM, Collier IE, Marmer BL, Eisen AZ, Grant GA, Goldberg GI: *SV-40-transformed human lung fibroblasts secrete a 92-kd type IV collagenase which is identical to that secreted by normal human macrophages. J Biol Chem* **264**: 17213, 1989
- 5) Daidone MG, Silvestrini R, Derrico A, Di Fronzo G, Benini E, Mancini AM, Garbisa LA, Grigioni WF: *Laminin receptors, collagenase IV and prognosis in node negative breast cancers. Int J Cancer* **48**: 529, 1991
- 6) Monteagudo C, Merino MJ, San-Juan J, Liotta LA, Stetler-Stevenson WG: *Immunohistochemical distribution and type IV collagenase in normal, benign and malignant breast tissue. Am J Pathol* **136**: 585, 1990
- 7) Sato H, Takino T, Okada Y, Cao J, Shinagawa A, Tamamoto E, Seiki M: *A matrix metalloproteinase expressed on the surface of invasive tumor cells. Nature* **370**: 61, 1994
- 8) Haussen C, Dowdle EB: *Electrophoretic analysis of plasminogen activators in polyacrylamide gel containing sodium dodecyl sulphate and co-polymerized substrates. Ann Biochem* **102**: 196, 1980
- 9) Kleiner DE, Stetler-Stevenson WG: *Quantitative zymography: Detection of picogram quantities of gelatinases. Anal Biochem* **218**: 325, 1994
- 10) Brown PD, Levy AT, Margulies IMK, Liotta LA, Stetler-Stevenson WG: *Independent expression and cellular processing of Mr 72,000 type IV collagenase and interstitial collagenase in human tumorigenic cell lines. Cancer Res* **50**: 6184, 1990
- 11) Beahrs OH, Meyers MH: *Manual for staging of cancer. 1992, 4th ed., Philadelphia, Lippincott, pp148*
- 12) Liotta LA, Stetler-Stevenson WG: *Tumor invasion and metastasis: an imbalance of positive and negative regulation. Cancer Res* **51**: 5045s, 1991
- 13) Stetler-Stevenson WG, Krutzsch HC, Wachner MP, Margulies IMK, Liotta LA: *The activation of human type IV collagenase proenzyme. Sequence identification of the major conversion product following organomercurial activation. J Biol Chem* **264**: 1353, 1989
- 14) Van Der Stappen JW, Hendriks T, Wobbes T: *Correlation between collagenolytic activity and grade of histological differentiation in colorectal tumors. Int J Cancer* **45**: 1071, 1990
- 15) Otani Y: *The collagenase activities, interstitial collagenase and type IV collagenase in human stomach cancer: with special reference to local spreading and lymph node metastasis. Keio J Med* **39**: 159, 1990
- 16) Davis B, Miles DW, Happerfield LC, Naylor MS, Bobrow LG, Rubens RD, Balkwill FR: *Activity of type IV collagenases in benign and malignant breast disease. Br J Cancer* **67**: 1126, 1993
- 17) Brow PD, Bloxidge RE, Anderson E, Howell A: *Expression of activated gelatinase in human invasion breast carcinoma. Clin Exp Metastasis* **11**: 183, 1993
- 18) Brow PD, Bloxidge RE, Stuart NSA, Gatter KC, Carmichael J: *Association between expression of activated 72 kilodalton gelatinase and tumor spread in non-small cell lung carcinoma. J Natl Cancer Inst* **85**: 574, 1993
- 19) Nakagawa T, Kubota T, Kabuto M, Sato K, Kawano H, Hayakawa T, Lkada Y: *Production of matrix metalloproteinases and tissue inhibitor of metalloproteinases-1 by human brain tumors. J Neurosurg* **81**: 69, 1994
- 20) Davies B, Waxman J, Wasan H, Abel P, Williams G, Krausz T, Neal D, Thomas D, Hanby A, Balkwill F: *Levels of matrix metalloproteinases in bladder cancer correlate with tumor grade and invasion. Cancer Res* **53**: 5365, 1993