

## 두경부 악성종양 조직에서의 c-fos 암유전자 및 $\beta_2$ -microglobulin의 발현양상과 악성종양전이간의 상관성에 관한 연구

고신대학 의학부 이비인후과학 교실, 내과학 교실\*, 중앙연구소\*\*

김종애·곽정택·김미라·이종덕·김태형·

이강대·유태현·박병채\*·서진혜\*\*

Expression of c-fos Oncogene Product and  $\beta_2$ -microglobulin in  
Head and Neck Cancer : Correlation with Metastasis

Jong Ae Kim, M. D., Jeung Taek Kwak, M. D., Mi Ra Kim, M. D.,  
Jong Duk Lee, M. D., Tae Hyung Kim, M. D., Kang Dae Lee, M. D.,  
Tai Hyun Yu, M. D., Byung Chae Park, M. D.,\* Jin Hye Suh, M. Sc.\*\*

*Department of Otolaryngology, Internal medicine\*, Cancer Research Institute\*\*,*

*Kosin Medical College*

= Abstract =

All of oncogene were first described as part of the genome of RNA tumor viruses and were subsequently shown to be of cellular origin. These genes termed cellular oncogene (c-onc) appear to have been the evolutionary progenators of viral oncogenes. It is strongly suggested that cellular oncogene may possess an oncogenic potential. It is important to elucidate which and how cellular oncogenes can be activated for specific tissue types of human tumors.

In order to verify the possibility that the patterns of expression of oncogenes and HLA might be related to the metastasis of human head and neck cancer, the expression of c-fos and  $\beta_2$ -microglobulin in head and neck cancer (40 cases), and normal tissues (40 cases) were evaluated by immunohistochemical method with monoclonal antibodies.

The obtained results are as follows :

- 1) Numbers of stage II, III, IV were 14, 15, 11 respectively among 40 patients and of them laryngeal cancer was highest in incidence (25 cases).
- 2) The nuclear staining of anti c-fos product monoclonal antibody in 32 cases (80.0%) and membrane reaction of anti  $\beta_2$ -microglobulin monoclonal antibody in 35 cases (87.5%) were observed in normal cells.
- 3) The nuclei of cancer cells in 11 cases (78.6%) of stage II, 12 cases (80.0%) of stage III, 4 cases (36.4%) of stage IV were positively stained with anti c-fos product monoclonal antibody.
- 4) The membrane of cancer cells in 13 cases (92.9%) of stage II, 13 cases (86.6%) of stage

III, 4 cases (36.4%) of stage IV were positively stained with anti  $\beta_2$ -microglobulin monoclonal antibody.

- 5) Comparison between the metastatic and non-metastatic group showed that the expression rate of c-fos product (40 : 80%) and  $\beta_2$ -microglobulin (30 : 65%) was lower in metastatic group. ( $p < 0.05$ )

The present results indicate that the overall incidences of expression in stage IV head and neck cancer of c-fos product and  $\beta_2$ -microglobulin are significantly decreased as compared with normal counterparts and stage II. Such a difference is also noticed between metastatic and non-metastatic group.

Since the overall incidence of expression of these products is gradually decreased according to the stage of head and neck cancer and correlation with metastasis, it is conceivable that a tumor cell devoid of c-fos product and  $\beta_2$ -microglobulin expression might be regarded as metastatic phenotype in human head and neck cancer.

KEY WORDS: Immunohistochemical method · Expression of c-fos oncogene ·  $\beta_2$ -microglobulin · Metastatic phenotype.

## 서 론

인체에서 발생하는 모든 암세포들의 세포 생물학적 특성은 중단없는 세포분열로 정상적인 성장을 함으로써 주위 장기를 침범하고 원격장기로 전이하는 것이다<sup>30,34</sup>. 암의 발생은 세포의 성장과 조절이라는 생명의 근본적 현상과 깊은 관련이 있으므로, 정상세포가 암세포로 형질전환(transformation)을 일으키는 기전을 분자수준에서 규명하는 것은 매우 중요한 일이다. 즉 정상세포가 암세포로 전환되는 여러 요인 중에서도 유전자의 변화가 중요하다고 알려졌으며 따라서 암 유발기전을 연구하는데 필연적으로 유전자에 초점을 맞추게 되었다<sup>4,31,39</sup>. 정상세포가 암세포로 전환되는데에는 세포성 암유전자의 활성화가 필요하며 이것이 암발생의 전반적인 원인이 된다고 알려져 있으며, 현재까지 밝혀진 활성화 기전을 요약하면 전사 조절 서열 변화에 의한 세포성 암유전자의 활성화, 유전자증폭에 의한 활성화, 염색체 전위에 의한 암유전자의 활성화, 점돌연변이에 의한 활성화 등이다<sup>10</sup>.

암세포의 침습 및 전이에 대한 구체적인 기전은 아직 분명히 규명되어 있지 않으나 여러 연구에 의하면 암세포의 침습 및 전이에는

여러 생물학적 단계를 거치게 되는데, 먼저 종양세포들이 일차적으로 세포외기질(extracellular matrix)의 fibronectin 또는 기저막에 결합함으로써 시작되고 이러한 결합은 암세포막의 표면에 존재하는 수용체를 매개하여 이루어지며 교원효소(collagenase) 및 탄성조직 분해효소(elastase)와 같은 단백분해효소를 생산하여 기저막과 세포외기질들을 용해시키게 된다. 특히 세포외기질의 경우는 세포의 이동을 억제하는 정상적인 장벽이 제거 되므로 암세포들이 쉽게 주위조직으로 이동되어 용이하게 침윤과 전이가 이루어 질수 있다<sup>24</sup>. 최근의 연구에서 암유전자는 세포의 분화 및 증식에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있으며, 이러한 암유전자는 종양에서도 중요한 역할을 하여 암의 발생 뿐 만 아니라 전이에도 관계 있는 것으로 생각되며, 어떤 종류의 종양유전자의 비정상적 증폭(amplification)과 과도발현(over expression)은 종양발생 능력, 침습, 전이와 유관한 것으로 알려져 있고,<sup>5,8,12,27,32</sup> 보다 최근의 종양전이에 관한 연구에서는 분자유전학 분야까지 확장되고 있다<sup>23,35</sup>. 이러한 종양 유전자의 발현양상이나 형태의 변화 즉 비정상적 증폭이나 과도발현은 종양세포의 특이성에 따라 특이하게 나타난다고 알려져 있으며, 이를

이용하여 병기의 분류와 예후의 지표로서의 사용가능성 여부에 대한 시도가 이루어지고 있어 흥미롭다<sup>5,8,12,27,32</sup>.

v-fos 종양 유전자는 BALB/c mouse liver cell에서 처음 클론되었으며 골육종을 일으키는 retrovirus에 의해 운반되는 것으로 알려져 있고, 쥐에서 이러한 종양의 전이성이 v-fos 종양 유전자에 의해 조절되어지는 것으로 믿어지는 MHC(major histocompatibility complex) class I antigen의 상대적인 발현과 관계가 있다고 알려져 있다<sup>9,21,33</sup>.

$\beta_2$ -microglobulin(이하  $\beta_2$ -MG로 약함)은 모든 HLA(human leukocyte antigen)class I antigen의 작은 사슬을 형성하여 HLA의 발현에 중대한 역할을 하며,  $\beta_2$ -MG의 감소 혹은 소실은 HLA class I antigen 발현에 영향을 주며, T 림파구의 활성도를 저하시킨다<sup>17</sup>. 즉 HLA는 T림파구에 대한 수용체로 생각되며, 악성종양 환자에서 HLA의 소실은 T림파구 면역기능의 약화 즉 면역 인지(immune recognition)능력을 약화시켜 면역체계(immune network)의 결손을 초래하므로 세포독성 T림파구(cytotoxic T-cell)와 탐식세포(macrophage)에 의한 종양 세포의 소멸기능을 소실하게 되어 종양의 침습과 전이가 용이하게 된다.

이러한 기전에 의한 면역감시체계로부터의 이탈은 악성종양의 진행에 중요한 역할을 할 것이다. 이와 같이 악성종양에서 확인된  $\beta_2$ -MG 즉 HLA class I antigen의 발현의 감소는 모든 악성종양에 공통적으로 나타나는 현상일 것이라고 보고된 바 있다<sup>17</sup>. 저자는 파라핀에 포매된 두경부 악성종양조직 절편에서 c-fos암 유전자와  $\beta_2$ -MG의 발현양상을 관찰하여 이들의 변화가 임상적으로 두경부암의 경부전이와 상관성이 있는지를 규명하고자 본 연구를 시행하였다.

### 재료 및 방법

#### 1) 대 상

1990년 4월부터 1991년 6월까지 고신대학교

의학부 이비인후과학교실에서 두경부 악성종양으로 광범위 절제술을 시행한 환자 중 결과가 양호하여 관독이 가능하였던 40례(후두암 25례, 하인두암 5례, 구강암 8례, 편도암 1례, 상악암 1례)를 대상으로 하였고(표 1), 연령은 32세에서 73세까지로 평균 58세이었으며 남자 33명, 여자 7명으로 그 비는 5 : 1이었다(표 2). 병기는 AJCC(1988) 분류법<sup>3)</sup> 따라 분류하였고, 광역 절제술을 시행하지 않은 1기와 전신적 전이가 된 예는 연구대상에서 제외하였으며, 예수는 2기 14례, 3기 15례, 4기 11례 이었는데(표 3) 두경부암의 병기 및 경부전이와 상관성 여부를 알기 위해 술후 병리조직학적 검토후에 병기별로 나누었다. 또한 AJCC 분류법상 T3 N0와 같이 비전이암도 3기이고, T2 N1이나 T2 N2인 경우도 각각 3기와 4기로 분류되므로 병기만의 검토로는 전이와의 상관성을 알기 어렵기 때문에 경부입파절 전이가 있는 군(20례)과 없는 비전이군(20례)으로 나누어 비교하였

Table 1. Distribution of patients according to primary site (n=40)

Primary site	Number of patients
Larynx	25
Hypopharynx	5
Tongue	5
Mouth floor	1
Retromolar trigone	1
Tonsil	2
Maxilla	1
Total	40

Table 2. Age and sex distribution

Age	Sex	
	Male	Female
30~39	1	-
40~49	4	-
50~59	13	4
60~69	11	3
70~79	4	-
Total	33	7

Table 3. Distribution of patients according to stage (AJCC, 1988)

Primary site	Stage		
	II	III	IV
Larynx	10	11	4
Hypopharynx	-	-	5
Tongue	2	1	2
Mouth floor	1	1	-
Retromolar trigone	-	1	-
Tonsil	1	-	-
Maxilla	-	1	-
Total	14	15	11

다.

2) 조 직

수술실에서 얻어진 종양조직에서 0.5×0.5×0.5cm를 채취하여 즉시 -20℃에서 냉동 보관하거나 표본처리 24시간 이상 걸리는 경우는 -70℃에서 보관하였다. 대조군은 상부기도점막에서 얻은 정상조직 0.5×0.5×0.5cm크기의 조직 40례와 3Y1 세포, 10-1세포를 사용하였으며 β<sub>2</sub>-MG의 대조군으로는 β<sub>2</sub>-MG를 발현하지 않는 정상간세포와 발현되는 정상임파절조직을 사용하였다.

신선검체의 경우 -20℃에서 4μm두께의 냉동 절편을 작성하여 사용하였으며 대조군도 동결 생검으로 제공하였다.

3) 항 체

본 실험에 사용한 항체는 anti c-fos monoclonal antibody(이하 MoAb로 약함)(NIH, USA), β<sub>2</sub>-microglobulin MoAb(Becton-Dickson)를 사용하였다. 이들 MoAb의 적정농도는 10-1세포주와 임파절조직에 대한 적정검사 후에 만들었다. Biotinylated rabbit antimouse Ig과 avidin-biotin-peroxidase complex(이하 ABC로 약함)를 형성하는 시약은 면역조직화학적염색(immunohistochemical staining)을 위해 상품화(Vector Laboratory, Burlingame, CA)되어 있는 것을 사용하였다.

4) 면역 조직화학적 염색

수술실에서 채취된 종양조직과 정상조직을 4μm의 냉동절편으로 만든 다음, H-E stain을 시행하여 정상조직과 종양조직을 확인하고, 각각의 절편에 면역조직화학적 염색(immunohistochemical stain)을 시행하였다. 본 연구에 적용한 immunoperoxidase staining은 Hsu<sup>18)</sup>, Mitani<sup>20)</sup>가 기술한 방법을 수정하여 적용하였다. 그 방법을 간단히 요약하면, 동결조직 절편을 poly-L-lysine으로 피막처리된 미세 슬라이드에 올린 다음 10분간 공기중에서 건조하고 pH 7.4인 phosphate buffered saline(이하 PBS로 약함)을 혼합시킨 4% paraformaldehyde에 20분간 실온에서 고정하였다. 절편은 PBS에서 세척하고 blocking serum(1% 정상 말의 혈청)에 25분간 적신 후 절편을 0.1ml의 MoAb와 30분간 메타놀에서 0.3% hydroperoxidase에 담근 후 PBS로 세척하고 2단계 시약인 biotinylated rabbit antimouse immunoglobulin(1:100)액에 37℃에서 30분간 처리 한 후 PBS로 세척한 다음 3단계 시약인 ABC로 37℃에서 30분간 둔다. 그 다음 절편을 PBS로 다시 세척후 절편은 0.125mg/ml diaminobenzidine tetrahydro-chloride로 염색하여 광학 현미경으로 관찰하였다. 각각의 검체에 대한 대조군의 절편도 같은 방법으로 동시에 처리하였으며 각각의 MoAb의 적정농도는 1:50이었다.

검체에 대한 판정은 광학 현미경으로 관찰하여(-),(+),(++),(+++로 표기하였고, (+)는 전체세포수에서 30%까지,(+++는 60% 이상(++)는(+) 와(+++) 사이의 염색정도로 표시하였다. 통계적 분석은 chi-square test를 이용하여 분석하였다.

성 적

1) 정상조직에서 세포성 암유전자 c-fos와 β<sub>2</sub>-MG의 발현

정상조직에서 c-fos 암유전자는 중등도 및 고도로 염색된 예가 24례(60.0%), 경도로 염

색된 예가 8례(20.0%)로 80.0%에서 양성으로 발현되었고,  $\beta_2$ -MG도 각각 26례(65.0%), 9례(22.5%)로 87.5%에서 양성으로 발현되었다(표 4)(도 1-A,B,C).

2) 두경부 악성종양조직에서 세포성 암유전자 c-fos와  $\beta_2$ -MG의 발현

c-fos 암유전자는 2기(14례)에서는 중등도 이상의 발현이 8례(57.2%), 경도발현이 3례(21.4%)로 78.6%의 양성 발현을, 3기(15례)에서는 80%에서 양성 발현이 있었으나, 4기(11례)에서는 불과 27.2%의 양성 발현을 보여 2기와 3기에 비해 4기에서 유의하게 c-fos 암유전자의 발현이 감소되었다( $p < 0.05$ )(표 5).

$\beta_2$ -MG은 2기(14례)에서 92.9%, 3기(15례)에서 86.6%의 양성발현을 보인 반면, 4기(11례)에서는 36.4%의 발현을 보여 c-fos와 마찬가지로 2, 3기에 비해 4기에서  $\beta_2$ -MG의 발현이

감소하였다( $p < 0.05$ )(도 2-A,B,C 도 3-A,B)(표 6).

3) 전이암군과 비전이암군에서 세포성 c-fos 암유전자와  $\beta_2$ -MG의 발현

c-fos 암유전자는 전이암군 3기(9례), 4기(11례)의 20례에서 8례(40.0%), 비전이암군 2기(14례), 3기(6례)의 20례에서 16례(80.0%)에서 양성으로 발현되어 전이암군이 비전이암군에 비해 c-fos 암유전자의 발현이 감소되었다( $p < 0.05$ )(표 7,8).

$\beta_2$ -MG은 전이암군 3기(9례), 4기(11례)의 20례에서 6례(33.3%), 비전이암군 2기(14례), 3기(6례)의 20례에서 13례(65.0%)의 양성발현을 보여 전이암군에서  $\beta_2$ -MG의 발현이 감소됨을 알 수 있었다( $p < 0.05$ )(표 9,10).

이와 같은 성적으로 미루어 볼 때 진행된 두경부 악성종양 특히 4기에서는 2기 및 정상

Table 4. Incidence of c-fos and  $\beta_2$ -microglobulin product expression on normal tissue

	Number of controls	Intensity of staining		Total number of positive staining	Incidence of positive staining
		+++~++	+		
c-fos	40	24(60.0)	8(20.0)	32	(80.0)
$\beta_2$ -MG	40	26(65.0)	9(22.5)	35	(87.5)

$\beta_2$ -MG :  $\beta_2$ -microglobulin  
( ) represents percentage

Table 5. Incidence of c-fos product expression on head and neck cancer

Stage	Number of patients	Intensity of staining		Total number of positive staining	Incidence of positive staining
		+++~++	+		
II	14	8(57.2)	3(21.4)	11	(78.6)
III	15	7(46.7)	3(33.3)	12	(80.0)
IV	11	1( 9.0)	3(18.2)	3	(27.2)

( ) represents percentage

Table 6. Incidence of  $\beta_2$ -microglobulin product expression on head and neck cancer

Stage	Number of patients	Intensity of staining		Total number of positive staining	Incidence of positive staining
		+++~++	+		
II	14	7(50.0)	6(42.9)	13	(92.9)
III	15	5(33.3)	8(53.3)	13	(86.6)
IV	11	2(18.2)	2(18.2)	4	(36.4)

( ) represents percentage

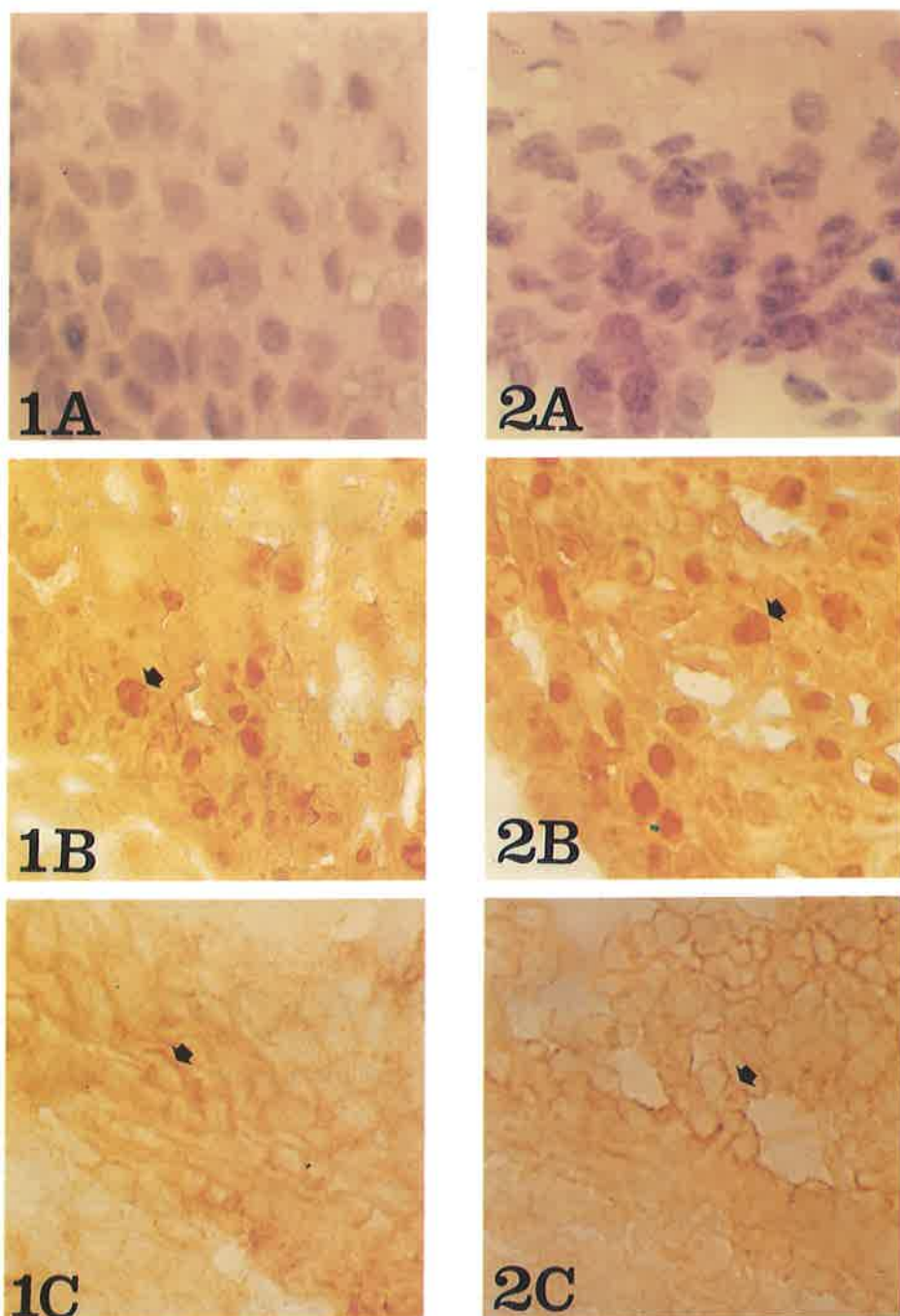


Fig. 1. Immunohistochemical staining of anti c-fos product MoAb with nuclei and anti  $\beta_2$ -MG MoAb with cell membrane of normal upper aerodigestive tissue. 1A, Normal mucosa (H-E stain). 1B, Intense (+++~++) expression of c-fos product with nuclei (arrow). 1C, Intense (+++~++) expression of  $\beta_2$ -MG with cell membrane (arrow) ( $\times 400$ ).

Fig. 2. Immunohistochemical staining of anti c-fos product MoAb with nuclei and anti  $\beta_2$ -MG MoAb with cell membrane of squamous cell carcinoma of head and neck. 2A, squamous cell carcinoma (H-E stain). 2B, Intense (+++~++) expression of c-fos product of nuclei (arrow). 2C, Intense (+++~++) expression of  $\beta_2$ -microglobulin of cell membrane (arrow) ( $\times 400$ ).

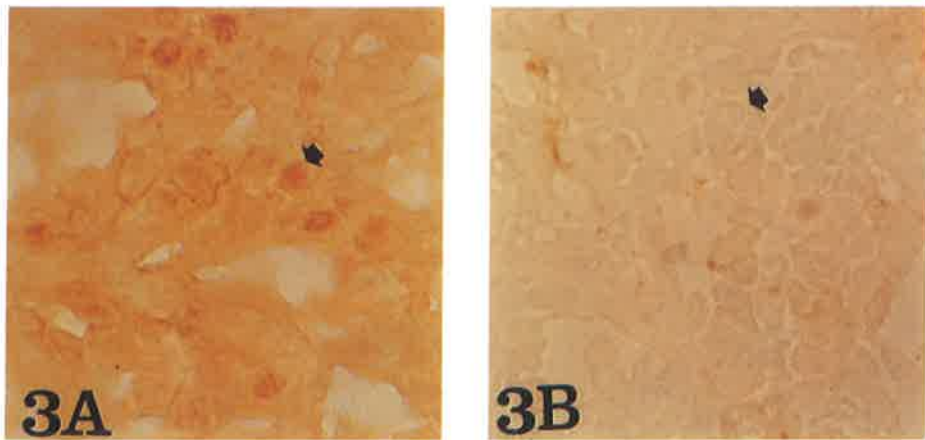


Fig. 3. Decreased expression of c-fos product and  $\beta_2$ -MG on advanced head and neck cancer. 3A, Weakly stained nucleus with anti c-fos product MoAb (arrow). 3B, Negatively stained cell membrane with anti  $\beta_2$ -microglobulin MoAb (arrow) ( $\times 400$ ).

Table 7. Incidence of c-fos product expression on metastatic group

Stage	Number of patients	Intensity of staining		Total number of positive staining	Incidence of positive staining
		+++~++	+		
III	9	3(33.3)	2(21.2)	5	(55.5)
IV	11	1( 9.1)	2(18.2)	3	(27.3)
Total	20	4(20.0)	4(20.0)	8	(40.0)

( ) represents percentage

Table 8. Incidence of  $\beta_2$ -microglobulin product expression on metastatic group

Stage	Number of patients	Intensity of staining		Total number of positive staining	Incidence of positive staining
		+++~++	+		
III	9	3(33.3)	0	3	(33.3)
IV	11	1( 9.1)	2(18.2)	3	(27.3)
Total	20	4(20.0)	2(10.0)	6	(33.3)

( ) represents percentage

Table 9. Incidence of c-fos product expression on non-metastatic group

Stage	Number of patients	Intensity of staining		Total number of positive staining	Incidence of positive staining
		+++~++	+		
III	14	8(57.1)	3(21.4)	11	(78.5)
IV	6	4(66.7)	1(16.7)	5	(83.4)
Total	20	12(60.0)	4(20.0)	16	(80.0)

( ) represents percentage

Table 10. Incidence of  $\beta_2$ -microglobulin product expression on non-metastatic group

Stage	Number of patients	Intensity of staining		Total number of positive staining	Incidence of positive staining
		+++~++	+		
III	14	7(50.0)	1( 7.1)	8	(57.1)
IV	6	3(50.0)	2(33.3)	5	(83.3)
Total	20	10(50.0)	3(15.0)	13	(75.0)

( ) represents percentage

대조군에 비해 c-fos 암유전자와  $\beta_2$ -MG의 발현이 현저히 감소되었고, 전이암군과 비전이암군 간의 비교에서 알 수 있듯이 전이암군에서 이들의 발현이 의의 있게 감소하였다.

### 고 찰

Dennis 등<sup>6)</sup>은 급격히 RNA 형질전환을 일으키는 대부분의 종양 바이러스는 종양의 발생에 연관이 있는 것으로 보이는 genomic sequence를 가지고 있다고 하였으며 이러한 유전자를 바이러스성 암유전자(viral oncogene, v-onc)라 한다. 바이러스성 암유전자가 어떻게 정상조직을 종양세포로 형질전환 시키는지에 대한 정확한 기전은 아직 잘 알려져 있지 않고 있으며 현재까지 19가지의 바이러스성 암유전자가 확인되고 분리되어 있다. 형질전환되지 않은 정상세포에서도 형질전환하는 유전자와 비슷한 DNA 서열이 발견되었는데 이를 세포성 암유전자(cellular oncogene, c-onc)라고 한다.

세포성 암유전자와 바이러스성 암유전자가 구조적 유사성을 가지는 사실은 세포성 암유전자도 종양발생력을 가지고 있음을 암시하는데, 그 근거로는 다음 세가지를 들 수 있다. 첫째, c-mos와 c-Ha-ras 암유전자를 NIH3T3 세포에 transfection 시켰을 때 형질전환이 유도되며, 둘째, avian leukosis virus(ALV)는 viral genome이 c-onc(c-myc)에 삽입됨으로써 암이 유발되며, 셋째, 몇몇 인체 종양 세포주와 종양을 mouse 3T3 cell에 반응시켰을 때 형질전환된 표현형(transformed phenotype)을 유도하는 유전자를 가진 점이다.

인체암에서의 세포성암유전자의 발현여부와, 또한 종양과 그에 상응하는 정상조직에서

암유전자 발현 정도의 차이 및 종양의 종류와 암유전자의 발현과의 연관성에 관한 보고도 적지 않다. ras 암유전자 산물은 p21로 작용부위가 세포질내이며 c-Ha-ras는 방광암, 위암, 폐암에서, c-Ki-ras는 대장암, 담낭암, 혈액암에서 상관성이 있다고 보고 되었고<sup>25)</sup>, c-erb B2는 유암에서 유전자 증폭과 단백질의 과도발현이 된다고 하였다<sup>13,15)</sup>. c-myc은 거의 모든 종류의 암에서 발현되며 그 암유전자 산물이 세포핵내에서 유전인자에 직접 작용함으로써 형질전환을 야기시키는 핵단백질군으로 작용한다고 알려졌다<sup>20)</sup>.

c-fos 암유전자는 BALB/c mouse liver cell에서 처음 클론되었으며 작용부위는 세포핵으로 골육종을 일으키는 retrovirus에 의해 운반되는 것으로 알려져 있고, 이러한 동물종양에서의 전이성이 c-fos 암유전자에 의해 조절되는 것으로 추정되는 MHC class I antigen의 상대적 발현과 관계가 있다고 한다<sup>9,21,33)</sup>. 이와 같은 사실은 본 연구에서도 알 수 있었는데 각 병기별 및 전이군과 비전이군과의 비교에서 나타났듯이 c-fos 암유전자의 발현이 감소될 경우는  $\beta_2$ -MG의 발현도 이에 일치하여 비례적으로 감소됨을 관찰할 수 있었다.

$\beta_2$ -MG은 모든 HLA class I antigen의 작은 사슬을 형성하여 HLA의 발현에 중대한 역할을 하여,  $\beta_2$ -MG의 감소 혹은 소실은 HLA class I antigen 발현에 영향을 주게되고 T림프구의 활성도를 저하시킨다<sup>17)</sup>. MHC class I antigen의 면역체계의 역할은 Plaksin 등<sup>33)</sup>에 의한 syngeneic H-2K<sup>b</sup> gene을 사용한 전이성 표현형에 관한 연구에서 보고된 바와 같이, H-2K<sup>b</sup> MHC class I antigen이 감소되었을 때 전이성이 강한 murine 3 Lewis lung carcinoma clone의 과도발현을 나타내며, H-2K<sup>b</sup> 유전자로 transfection된 경우 전이성이 강한 형을 비전



이형 혹은 약한 전이형으로 전환시킨다. 이러한 H-2K<sup>b</sup> 유전자와 유사하게, ras 암유전자 산물의 발현에서도 면역조직화학적 염색을 보면 ras p21 산물의 과도발현이 종양의 발생, 진행, 전이에 중요한 역할을 수행할 것으로 생각되며, 현재 악성종양에 있어서 MHC class I antigen의 상대적 발현이 동물실험에서 침습 및 전이와 관련된 많은 증거들이 보고 되고 있다. 즉 HLA antigen은 T 임파구에 대한 수용체로 생각되며 악성종양 환자에서 HLA의 소실은 T 임파구 면역기능의 약화 즉 면역 인지를 할 수 없으므로 면역체계의 결손을 초래하여 세포독성 T-임파구와 탐식세포에 의한 종양세포의 소멸기능이 소실되어 종양의 침습과 전이가 활발해진다. 이러한 기전에 의한 면역감시체계로부터의 이탈은 악성종양의 진행에 중요한 역할을 할 것이다. 이와 같이 악성종양에서 확인된  $\beta_2$ -MG 즉 HLA class I antigen의 발현 감소는 모든 악성종양에 나타날 것이라는 보고도 있다<sup>17)</sup>. 따라서 c-fos 암유전자, HLA class I antigen 산물과 인체 두경부 암의 침습과 전이간 상관관계의 여부 및 그 정도를 알아 보아 침습과 전이의 가능성을 시사하는 한 지표를 작성할 목적으로 본 연구를 실시하였다.

본 연구에서 두경부 악성종양의 c-fos 암유전자의 발현은 정상 대조군(80.0%)과 2기(78.6%)에 비해 4기(27.2%)에서 현저히 감소하였다. 박 등<sup>11)</sup>이 위선암조직 145례에서 관찰한 바에 의하면 조기위암 15례 중 15례(100.0%), 2기 30례 중 21례(70.0%) 3기 43례 중 18례(41.8%), 4기 57례 중 12례(21.1%)에서 c-fos 암유전자 양성 발현이 나타나 본 연구 성적과 유사하였다.  $\beta_2$ -MG은 박 등<sup>11)</sup>에 의하면 조기위암에서 100% (15/15), 2기에서 66.7% (20/30), 3기에서 48.8% (21/43), 4기에서 10.5% (6/57)로 나타나 본 연구 성적인 2기 92.9%, 3기 86.6%, 4기 4례 36.4%에서와 같이 병기가 진행될수록 발현이 감소된다는 점에서 일치하였다. Holden 등<sup>16)</sup>은 피부암에서  $\beta_2$ -MG의 소실을 관찰하고  $\beta_2$ -MG의 소실이 악성종양의 표현형임을 시사하였다. 또한 전이암과 비전이암의 비교에서도 c-fos 암유전자의 발현의 비는 전이

암에서 40%, 비전이암에서 80%,  $\beta_2$ -MG의 발현은 전이암에서 33%, 비전이암에서 65%로 전이암에서 c-fos 암유전자와  $\beta_2$ -MG의 발현이 다같이 감소하였다. 즉 c-fos 암유전자 및  $\beta_2$ -MG의 발현은 초기의 두경부 악성종양에 비해 진행된 경우와 전이암에서 감소하였다. 이는 Feldman 등<sup>10)</sup>의 보고와 같이 c-fos 유전자의 mRNA 전사는 주로 전이성향이 적은 암에서 나타나고 전이성이 강한 암에서는 관찰되지 않았던 성적과 같은 결과이었다. 두경부 악성종양에 있어서 암유전자의 발현에 관한 보고는 아직 미흡한 실정이나 국내에서는 문 등<sup>20)</sup>이 두경부 암에서 c-myc 암유전자의 과도발현유무를 slot blot analysis로 관찰하여 14례 중 2례에서 유전자의 증폭을 보고하였고 2례 모두에서 임파결 전이가 있었다고 하였다. Kushtai 등<sup>21)</sup>은 전이성이 강한 D122 cell에 c-fos 암유전자를 작용시켜 다음과 같은 사항을 관찰하였다.

c-fos 암유전자 산물이 생산된 후에 c-fos 유전자와 이들 세포가 H-2K<sup>b</sup> gene을 순차적으로 발현시켰으며, 따라서 c-fos 암유전자 산물이 MHC class I(H-2K<sup>b</sup>) 산물에 대한 gene coding을 조절 하는 것 같았다. 동물실험에서 관찰된 이러한 결과로 본 연구에서는 c-fos산물과  $\beta_2$ -MG의 동시 발현의 기전을 설명할 수 있으며, 동물실험 즉 쥐의 악성종양에서의 MHC class I antigen의 발현양상에 관한 실험적 관찰조건과도 잘 일치한다.

많은 종류의 인체암 특히 상피세포암에서 HLA class I antigen이 매우 감소되는데, 이러한 것으로는 폐의 소세포암<sup>7)</sup>, 편평상피암<sup>37)</sup>, 신경아세포종<sup>22)</sup>등이고, HLA class I 산물이 결손되어 있는 종양세포주도 역시 상기 종양과 유암<sup>11,20)</sup>, 악성흑색종<sup>28)</sup>, 대장암<sup>36,38)</sup>, 유모막암<sup>19)</sup>등이 있다.

HLA class I antigen 발현의 감소와 악성종양의 침습과 전이의 정도의 상관 관계는 앞으로 보다 많은 연구가 있어야 할 것으로 생각된다. 본 연구에서 두경부 악성종양에서의 HLA class I antigen과  $\beta_2$ -MG의 발현저하의 기전과 암세포의 침습 및 전이성향과의 관계에

대해서는 예수가 적어 명확하게 설명할 수는 없지만, 전이성 종양은 비전이성 종양에 비해 HLA antigen의 발현이 감소되어 있다는 점에서 양자간의 상이성을 지적할 수 있다. 이러한 결과로 미루어 볼 때 전이를 일으키는 다단계 (metastatic cascade)의 어떤 단계에서든지 MHC class I antigen을 발현하는 종양세포는 HLA class I antigen에 연관된 세포독성 T림파구에 의해 제거될 수 있으며, 비전이성 표현형의 하나로서 보일 수 있는 반면, HLA class I antigen이 없는 종양세포는 면역체계를 통과하게 되고 따라서 전이성 표현형으로 나타나게 될 것이다.

본 연구에서 관찰된 결과를 살펴보면 진행된 두경부암에서의 c-fos 산물,  $\beta_2$ -MG의 발현 감소는 정상조직 및 초기의 두경부암에 비해 의미있게 감소하였으며, 이렇게 병기가 진행될수록 c-fos 산물과  $\beta_2$ -MG의 발현이 감소하고 또 c-fos산물 및  $\beta_2$ -MG이 소실되는 표현형은 진행된 두경부암의 생리적 특성 중의 하나로 생각할 수 있다. 이러한 진행된 예 및 전이암에서 현저하게 나타나는 c-fos 암유전자와  $\beta_2$ -MG의 감소는, 이 종양의 전이성 표현형으로 생각되며 본 연구를 통한 두가지의 임상적 가능성으로는 1) 원발성 두경부 악성종양에 있어서 조직검사상의 c-fos 산물과  $\beta_2$ -MG의 감소는 병기와 예후 판정에 도움을 줄 수 있고 2)

c-fos 산물과 HLA class I antigen의 발현을 증대시킬 수 있는 생물학적 반응 조절자(biologic response modifier)로 두경부 악성 종양에 대한 술전, 술후 치료에 응용할 수 있으리라 생각된다.

## 요 약

두경부 악성종양 40례를 대상으로 두경부암의 침습과 전이가 c-fos 암유전자와  $\beta_2$ -MG의 발현양상과 연관이 있을 것이라는 가능성을 증명하기 위해 면역조직화학적 염색을 이용한 실험결과를 다음과 같이 요약한다.

1) 전체 40례 중 병기별 예수는 2기, 3기,

4기 각각 14, 15, 11례 이었다.

2) 정상대조군 40례에서 c-fos 암유전자와  $\beta_2$ -MG의 발현율은 각각 80.0%이었다.

3) c-fos 암유전자 산물 단클론성 항체로 암세포핵을 염색한 결과 양성 반응을 나타낸 경우는 2기에서 78.6%, 3기에서 80.0%, 4기에서 27.2%로 2기, 3기에 비해 진행된 암인 4기에서 c-fos 암유전자의 발현이 유의있게 감소되었다.

4) 암세포의 세포막에 대한 반응으로  $\beta_2$ -MG 단클론성 항체로 양성반응을 보인 예는 2기에서 92.9%, 3기에서 86.6%, 4기에서 36.4%로서 진행된 예에서 유의있게 발현이 감소되었다.

5) c-fos 암유전자의 발현율은 전이암에서 40%, 비전이암에서 80%,  $\beta_2$ -MG의 발현의 경우는 전이암에서 33.3%, 비전이암에서 65.0%로 전이암에서 c-fos 암유전자와  $\beta_2$ -MG의 발현율이 다같이 감소하였다.

이상의 결과로 진행된 두경부 악성종양과 전이암은 c-fos 암유전자와  $\beta_2$ -MG의 발현률이 감소하며 따라서 c-fos 암유전자와  $\beta_2$ -MG의 발현률의 감소 혹은 소실된 암세포는 두경부 악성종양의 전이성 표현형으로 생각할 수 있다고 추찰되었다.

## References

1. 박병채, 서진혜, 강구일 등 : 원발성 위선암 조직에서의 c-myc, c-H-ras, c-fos 암유전자,  $\beta_2$ -microglobulin 및 laminin receptor의 발현양상과 위암의 심달도 및 전이와의 관련성에 대한 연구. 대한소화기병학회지 23 : 408~422, 1991.
2. 문한림, 한치화, 김훈교 등 : 두경부 편평상피암 조직에서 c-myc 종양유전자의 증폭. 대한암학회지 22 : 32~36, 1990.
3. Beahrs OH, Henson DE, Hutter RVP, et al : Manual for staging of cancer. Lippincott PA 1988, p 69.
4. Collard JG, Roos ED, La Riviere G, et

- al : Genetic analysis of invasion and metastasis. *Cancer Surveys* 7 : 691~710, 1988.
5. Collard JG, Schijven JF, Roos E : Invasive and metastatic potential induced by ras-transfection into mouse BW5147 T-lymphoma cells. *Cancer Res* 47 : 754~759, 1987.
  6. Dennis JS, Jean BD, Inder MV, et al : Expression of cellular oncogenes in human malignancies. *Science* 224 : 256~262, 1984.
  7. Doyle A, Martin WJ, Funa K, et al : Markedly decreased expression of class I histocompatibility antigens, protein, and mRNA in human small cell lung cancer. *J Exp Med* 161 : 1135~1151, 1985.
  8. Egan SE, Broere JJ, Jarolim L, et al : Coregulation of metastatic and transforming activity of normal and mutant ras genes. *Int J Cancer* 43 : 443~448, 1989.
  9. Eisenbach L, Gubbay J, Gelber C, et al : Control of MHC genes that regulate the metastatic phenotype of tumor cells. In *Cancer metastasis : Biological and biochemical mechanisms and clinical aspect*(K Hellman, LA Liotta and G Prodi eds). Plenum, New York, 1988.
  10. Feldman M, Gelber C, Plaksin D, et al : The reversal of the metastatic phenotype by gene transfer. *Metastasis*. Wiley, chichester(Ciba foundation symposium 141) pp 170~192, 1988.
  11. Fleming, K, McMichael A, Morton JA, et al : Distribution of HLA class I antigens in normal human tissues and in mammary cancers. *J Clin Pathol* 34 : 779~784, 1981.
  12. Garbisa S, Pozzatti R, Muschel R, et al : Secretion of type IV collagenolytic protease and metastatic phenotype : Induction by transfection with c-Ha-ras but not c-Ha-ras plus Ad2-Ela. *Cancer Res* 47 : 1523~1528, 1987.
  13. Garcia I, Dietrich PY, Aapro M : Genetic alterations of c-myc, c-erbB-2, and c-Ha-ras protooncogenes and clinical associations in human breast carcinomas. *Cancer Res* 49(23) : 6675, 1989.
  14. Graham FI, Van Dreb AJ : New technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA. *Virology* 52 : 456, 1973.
  15. Guerin M, Gabillot M, Mathieu MC : Structure and expression of c-erb-2 and EGF receptor genes in inflammatory and non-inflammatory breast cancer : prognostic significance. *Int J Cancer* 43(2) : 201, 1989.
  16. Holden CA, Sanderson AR, McDonald DM : Absence of human leukocyte antigen molecules in skin tumors and some cutaneous appendages : evidence using monoclonal antibodies. *J Am Acad Dermatol* 9 : 867~871, 1983.
  17. Holden CA, Shaw M, Mekee PH, et al : Loss of membrane  $\beta_2$ -Microglobulin in eccrine porocarcinoma. *Arch Dermatol* 120 : 732~5, 1984.
  18. Hsu SM, Raine L, Fanger H : A comparative study of the peroxidase-antiperoxidase method and avidin-biotin complex method for studying polypeptide hormone with radioimmunoassay antibodies. *Am J Clin Pathol* 75 : 734~738, 1981
  19. Jones EA, Bodiner WF : Lack of expression of HLA antigens on choriocarcinoma cell lines. *Tissue antigens* 16 : 195~202, 1980.
  20. Klein G : The role of gene dosage and genetic transposition in carcinogenesis. *Nature* 294 : 290, 1981.
  21. Kushtai G, Barzilay J, Feldman M, et al : The c-fos protooncogene in murine 3

- LL carcinoma clones controls the expression of MHC genes. *Oncogene* 2 : 119~127, 1988.
22. Lampson LA, Fisher CA, Whelan JP : Striking paucity of HL A-A, B, C, and  $\beta_2$ -microglobulin on human neuroblastoma cell lines. *J Immunol* 130 : 2471~2478, 1983.
  23. Liotta LA : Tumor invasion and metastasis-Role of extracellular matrix : Rhoads memorial award lecture. *Cancer Res* 46 : 1~7, 1986.
  24. Liotta LA, Nageswara R, and Ulla MW : Biochemical interactions of tumor cells with the basement membrane. *Ann Rev Biochem* 55 : 1037~1057, 1986.
  25. Mariano B : Human oncogenes. Important Advances in Oncology 1 : 3, 1986.
  26. Mitani S, Sugawara I, Shiku H, et al : Expression of c-myc oncogene product and ras family oncogene products in various human malignant lymphomas defined by immunohistochemical techniques. *Cancer* 62 : 2085~2093, 1988.
  27. Monnat M, Tardy S, Saraga P, et al : Prognostic implications of expression of the cellular genes MYC, FOS, HA-RAS and KI-RAS in colon carcinoma. *Int J Cancer* 40 : 293~299, 1987.
  28. Nanni P, Colombo M, De Giovanni C, et al : Impaired H-2 expression in B16 melanoma variants. *J Immunogenet* 10 : 361~370, 1983.
  29. Natali PG, Giacomini P, Bigotti A, et al : Heterogeneity in the expression of HLA and tumor-associated antigens by surgically removed and cultured breast carcinoma cells. *Cancer Res* 43 : 660~668, 1983.
  30. Nicolson GL : Cancer Metastasis : Organ colonization and the cell surface properties of malignant cells. *Biochemica et Biophysica Acta* 695 : 113~176, 1982.
  31. Nowell PC : Mechanisms of tumor progression. *Cancer Res* 46 : 2203~2207, 1986.
  32. Ohuchi N, Hand PH, Merlo G, et al : Enhanced expression of c-H-ras p21 in human stomach adenocarcinomas defined by immunoassays using monoclonal antibodies and in situ hybridization. *Cancer Res* 47 : 1413~1420, 1987.
  33. Plaksin D, Gelber C, Feldman M, et al : Reversal of the metastatic phenotype in Lewis lung carcinoma cells after transfection with synergic H-2K gene. *Proc Natl Acad Sci* 85 : 4463~4467, 1988.
  34. Poste G, Fidler IJ : The pathogenesis of Cancer Metastasis. *Nature* 238 : 139~145, 1980.
  35. Roos E : Cellular adhesion, invasion and metastasis. *Biochimica et Biophysica Acta* 738 : 263~284, 1984.
  36. Travers PJ, Arklie JL, Patillo J, et al : Lack of expression of HLA-A,B,C antigens in choriocarcinoma and other human tumor cell lines. *Natl Cancer Inst Mongr* 60 : 175~180, 1980.
  37. Turbitt ML, Mackie RM : Loss of  $\beta_2$ -microglobulin from the cell surface of cutaneous malignant and premalignant lesions. *Br J Dermatol* 104 : 507~514, 1981.
  38. Umplyby HC, Heinemann D, Symes MO, et al : Expression of histocompatibility antigens and characterization of mononuclear cell infiltrate in normal and neoplastic colorectal tissues of humans. *J Natl Cancer Inst* 74 : 1161~1168, 1985.
  39. Vogt M, Dulbecco R : Virus-cell interaction with a tumor-producing virus. *Proc Natl Acad Sci USA* 46 : 365, 1960.