



구강암의 침습과 확산에 관여하는 요소 - 부착분자, MMP, 세포외 기질

Invasive and dispersive factors in oral squamous cell carcinomas
; adhesion molecule, MMP and extracellular matrix

서울대학교 치과대학 구강병리학교실

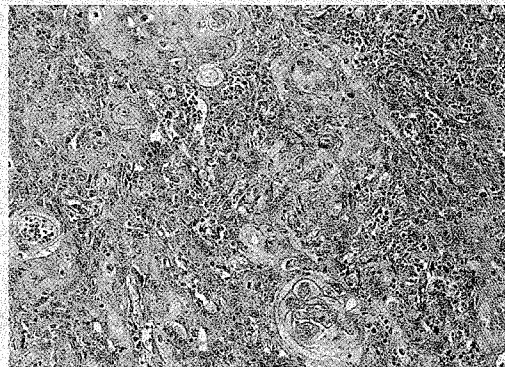
부교수 이재일

구강암은 구경부에서 가장 흔히 발생하는 암으로 성공적인 치료가 매우 어려운 질환이다. 구강암의 예후가 나쁜 것은 두경부의 해부학적인 특성과 함께 높은 암세포의 침습성 때문이다. 따라서 원발성 구강암의 침습성을 평가하는 것이 구강암 환자의 예후를 개선시키는 데 있어 매우 중요하다. 구강암의 침습에는 몇 가지 요소가 영향을 미친다. 기저막(basement membrane)은 주로 제 4형 교원(collagen), 라미닌(laminin) 그리고 단백다당류(proteoglycan)인 heparan sulfate로 구성되어 있으며 종양침습 시 일차 방어막의 역할을 하게 된다. 단백분해효소(proteinase)는 침습하는 종양세포에 의해 형성되며 세포 외 기질의 분해에 필수적이다. 종양세포에 의해 형성되는 기질단백분해효소는 표적 물질에 대한 작용에 따라 크게 3종류로 나누어진다. 여기에는 1) serine proteinases, 2) cystein proteinases, and 3) matrix metalloproteinases (MMPs)가 있다. Serine proteinases에는 plasminogen activators (PAs), leukocyte elastase, cathepsin G가 있다. MMP는 zinc-dependent protease로서 많은 구성원을 가지고 있다. 여기에는 collagenase(MMP-1), neutrophil collagenase (MMP-8), Stromelysin-1 (MMP-3), Gelatinase A (MMP-2), Gelatinase B (MMP-9) 등이 있으

며 최근에 막형 MMP가 발견되었다. 이중에서도 특히 72kD의 MMP-2와 92kD의 MMP-9은 종양 세포의 악성도와 밀접한 연관관계가 있는 것으로 보고되고 있다. 이들 MMP는 TIMP에 의해 활성이 억제된다. 이 모든 과정은 세포표면의 부착물질로부터 시작하는 복잡한 세포 내 신호전달체계에 의해 조절된다.

악성종양의 특징

악성종양은 1) 무제한의 성장, 2) 주변조직으로의 침습, 3) 발생부위에서 먼 조직으로의 전이, 4) 세포 표면 수용기의 변화 등을 기본적인 특징으로 한다.





구강편평세포암종 Oral Squamous Cell Carcinoma

구강암은 매우 침습을 잘하는 암종의 하나로 주변의 기저막을 조기에 파괴하고 주변조직으로 쉽게 침습하며 전이가 흔히 나타난다. 대부분의 두경부 편평세포암종은 높은 침습성과 함께 잦은 전이를 보인다. 이것은 결국 중요한 인체의 기능을 손상시키고 생명을 위협하며 재발을 위한 높은 비용의 수술을 필요로 하게 만든다.

구강암이 주변조직으로 침습하기 위해서는 바로 주위를 둘러싸고 있는 기저막을 파괴해야 하는데 이 기저막은 laminin, fibronectin, 제4형 교원 같은 몇 가지 세포 외 기질로 구성되어 있다. 그 다음으로 종양세포의 침습과 전이가 일어나기 위해서는 먼저 세포외기질과 기저막의 급격한 재구성(remodeling)이 나타나며 이후 단백질분해-세포의 기질부착-이동의 순서로 전이가 일어나게 된다.

단백질의 분해 Proteolysis

먼저 전술한 serine proteases, cystein proteases, matrix metalloproteinases 등의 효소에 의한 ECM의 분해가 일어나게 된다. 두경부 암종의 확산에 관여하는 효소에는 urokinase type plasminogen activator(uPA), 1형 및 4형 단백질분해 효소 등의 몇 종의 교원 분해효소, stromelysin 등의 단백질분해 효소가 있으며 이들은 종양 세포나 인접 결합조직 세포에서 형성된다.

교원분해 효소 Collagenase

매우 많은 구성원을 가지고 있으며 이 중에서 구강암의 침습에 관계가 깊은 것이 제 1형과 제4형 교원분해 효소이다. 이 중 제4형 교원 분해효소는 주로 기저막의 파괴에 관여하며 제1형 교원 분해효소와 stromelysin은 기질의 파괴에 관여한다.

금속함유기질단백분해효소 Matrix Metalloproteinases (MMPs)

아연(Zinc)의존성 endopeptidase로 17종이상의 구성원을 가진다. 불활성인 zymogen 형태로 분비되며 다양한 cytokines과 성장인자(growth factors)에 의해 활성화 된다. 이 중 기저막의 분해에 직접적인 역할을 하는 것은 제4형 교원 분해 효소인 MMP-2와 MMP-9이다.

MMP-9, 92kDa 제 4형 교원분해 효소 type IV collagenase

MMP-9는 불활성인 전구효소의 형태로 분비되며 아미노말단의 73개의 아미노산이 제거되면서 활성화 된다. 이들의 활성화는 physiological inhibitor인 TIMP-1, TIMP-2에 의해 억제되는데 이들은 MMP와 non-covalent complexes를 형성한다. 종양의 침습과 관련해서는 이 교원분해효소의 분비가 특정 세포의 전이성과 관계가 있는 것이 몇 가지 동물실험을 통해 알려져 있다. 두경부 암종에서는 MMP-9 mRNA와 단백질이 종양세포에서 발견되며, 이는 적출된 종양조직이나 배양세포 모두에서 나타나는 것으로 보고되고 있다. MMP-9가 종양 세포의 침습에 중요한 역할을 하는 것으로 보이며 실험적으로 억제 인자인 TIMP-2가 종양세포의 기질을 통한 침투를 방해하는 것으로 알려져 있다.

MMP-2, 72kDa 제 4형 교원분해 효소 type IV collagenase

MMP-2는 폐암을 포함한 몇 가지 형태의 종양에서 침습과 관련이 있다. MMP-2 16번 염색체 상에 있는 27kb 크기의 13 exon 유전자에서 형성된다. 이 효소의 합성은 MMP-9과는 분리된 기전을 통해 형성되며, 합성의 조절은 전사(translation) 전, 후에 각각 이루어 진다. MMP-2는 대부분 종양 주변조직의 기질세포에서 형성되는 것으로 알려

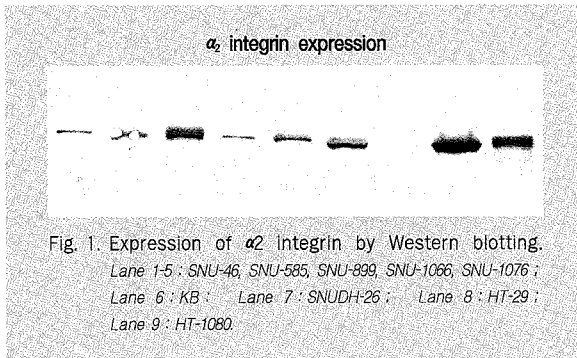


Fig. 1. Expression of $\alpha 2$ Integrin by Western blotting.
Lane 1-5: SNU-46, SNU-585, SNU-899, SNU-1066, SNU-1076;
Lane 6: KB; Lane 7: SNUDH-26; Lane 8: HT-29;
Lane 9: HT-1080

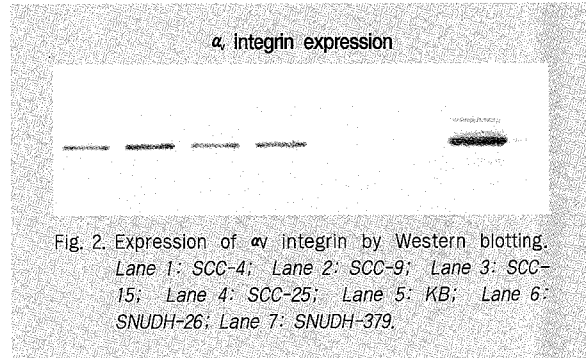


Fig. 2. Expression of αv Integrin by Western blotting.
Lane 1: SCC-4; Lane 2: SCC-9; Lane 3: SCC-15;
Lane 4: SCC-25; Lane 5: KB; Lane 6: SNUDH-26;
Lane 7: SNUDH-379

져 있다.

제 1형 교원분해효소 Type I collagenase

섬유성 교원을 분해하는 간질 교원분해효소로 제 1,2,3형 교원의 α chain 을 분해해서 1/4와 3/4의 조각으로 만든다. Muller 등은 두경부암에서 northern blotting 을 통해 모든 종양 조직에 다 존재하나 정상 점막에서는 나타나지 않는 것을 확인하였다. Gray 등은 이 mRNA가 종양에 인접한 기질세포에서 나타나는 것으로 보았으며 Muller 등은 다시 이들 효소가 종양 세포 전체에 골고루 나타나는 것으로 보고하였다.

Stromelysin

MMP-3(stromelysin-1) 는 57kda과 59kda zymogen 형태이며 각각 45 와 28kda의 단백질로 활성화된다. 이 것은 4형 교원, laminin, proteoglycan, fibronectin을 분해하며 procollagenase를 활성화 시킨다. Stromelysin-2 는 stromelysin-1과 78%의 유사성을 가지고 기질특이성도 유사하다.

Muller 등은 두경부암중에서 northern blotting의 방법으로 stromelysin-2에 해당되는 19kb mRNA 가 뚜렷이 증가하는 것을 확인하였다. 이중 구강이나 구인두에서 70%, 인후부아래에서 45%가 높은 비율로 나타났으며 전체는 57%였다. 높은

stromelysin-2 mRNA expression을 보이는 경우 침습성도 높은 것으로 나타났다. 그리고 이 같은 발현은 종양세포 뿐 아니라 종양조직에 인접한 기질 세포에서도 나타났다. 또 Muller 등은 두경부암중에서 stromelysin-1은 발견하지 못하였으며 95%의 레에서 stromelysin-3 gene overexpression을 확인하였고 mRNA는 종양과 인접한 기질세포에서 발현되었다. 이들도 국소적 침습성과 직접적인 상관관계를 가진 것으로 확인하였다. Polette 등은 18례의 두경부 암중에서 16례에서 stromelysin-3 이 나타남을 보고하였다. TIMP-1, TIMP-2는 분화가 좋은 암종의 인접 기질 세포에서 발현되는 것으로 알려져있다.

막형 MMP, MT-MMP

in vitro에서 MMP-2를 활성화 시키며 종양세포 표면에서 주로 나타난다. (Sato et al.) 특이하게도 Okada 등에 따르면 단백질은 종양세포 표면에 나타나나 transcript는 stroma에서만 발견되었다. 이 것은 MT-MMP가 아마도 기질세포의 표면에서 활성화되어 종양세포 표면에 부착하는 것으로 짐작한다.

Urokinase

Urokinase-type plasminogen activator(uPA)로서 plasmin을 활성화 시킨다. Plasmin은 광범위하게 작용하는 serine protease로서 laminin을 분해하

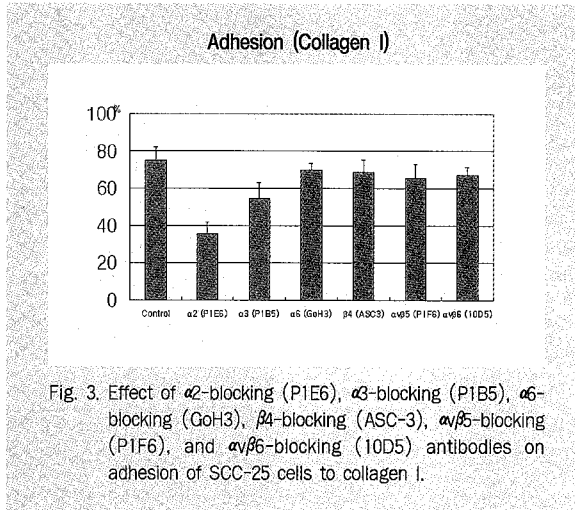


Fig. 3. Effect of $\alpha 2$ -blocking (P1E6), $\alpha 3$ -blocking (P1B5), $\alpha 6$ -blocking (GoH3), $\beta 4$ -blocking (ASC-3), $\alpha v\beta 5$ -blocking (P1F6), and $\alpha v\beta 6$ -blocking (10D5) antibodies on adhesion of SCC-25 cells to collagen I.

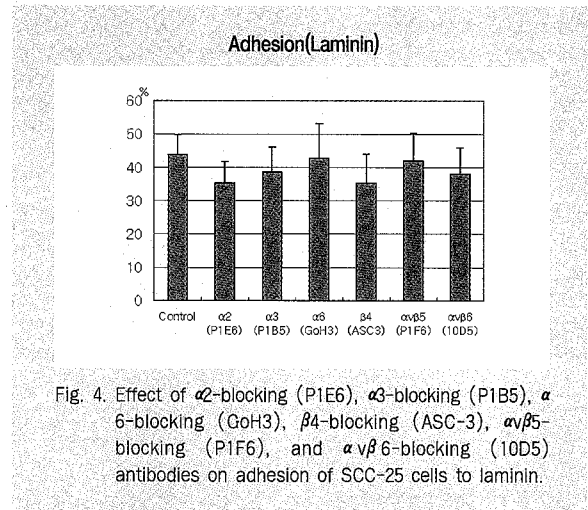


Fig. 4. Effect of $\alpha 2$ -blocking (P1E6), $\alpha 3$ -blocking (P1B5), $\alpha 6$ -blocking (GoH3), $\beta 4$ -blocking (ASC-3), $\alpha v\beta 5$ -blocking (P1F6), and $\alpha v\beta 6$ -blocking (10D5) antibodies on adhesion of SCC-25 cells to laminin.

고 제4형 교원 분해효소를 활성화시키고 제4형 교원자체를 분해한다. Urokinase는 세포 외 기질의 분해를 조절 함으로서 종양세포 침습에 주요한 역할을 하는 것으로 보인다. Urokinase 특이성 항체가 HEp3 종양세포가 폐와 림프절로 전이하는 것을 억제 하였다.(Ossowski L, Reich E. 1983) 그리고 urokinase의 overexpression은 흑색종과 전립선 암종의 전이율을 증가 시켰다.(Yu와 Schultz, 1991, Achbarou 등, 1994) Sappino 등은(1991) In situ hybridization과 zymography로 urokinase가 편평세포암종의 종양세포에서 생산되는 것을 확인하였다. Miller 등은 (1992) urokinase가 분화가 나쁜 편평세포암종에서는 발현되나 분화가 좋은 경우에는 나타나지 않는다고 보고 하였다. Urokinase의 유전자는 6.4kb의 크기로 11 개의 exon으로 구성되어 있다. (Riccio 등, 1985). 이 유전자는 5' 부위의 2.3 kb크기의 flanking sequence에 의해 조절된다 (Verde P, 등, 1988). 이 유전자는 다양한 transcription factor의 결합부위가 존재하며 여기에는 AP-1, PEA3, NF-kappaB, NF-1, SP1, camp response element 등이 있다. MRNA는 2.4kb의 크기로 분자량 55,000의 Single chain glycosylated proenzyme(sc-u-pa) 을 만든다.

urokinase 발현은 phorbol ester, EGF, calcitonin 등에 의해 조절되는데 여기에는 AP-1, PEA3,

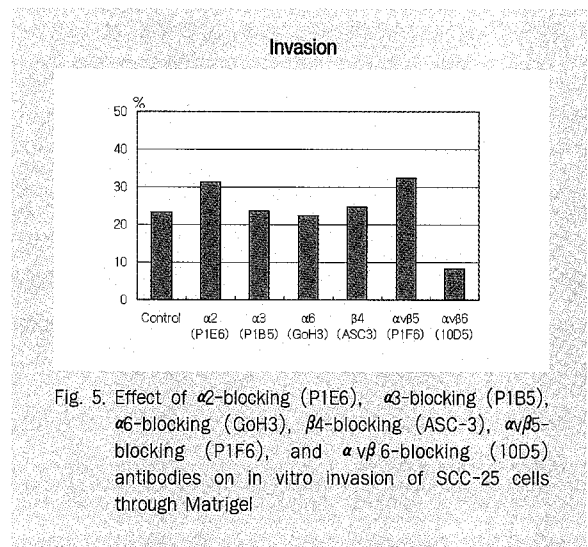


Fig. 5. Effect of $\alpha 2$ -blocking (P1E6), $\alpha 3$ -blocking (P1B5), $\alpha 6$ -blocking (GoH3), $\beta 4$ -blocking (ASC-3), $\alpha v\beta 5$ -blocking (P1F6), and $\alpha v\beta 6$ -blocking (10D5) antibodies on in vitro invasion of SCC-25 cells through Matrigel.

NFkB에 대한 유전자상의 결합부위가 정상적으로 유지되어야 한다. 이 결합부위의 돌연변이로 인한 변화는 유전자 발현이 불가능하게 만든다. urokinase promoter의 AP-1 motif는 c-jun/ATF-2 heterodimers와 결합하여 이것이 이 조절자의 활성화에 필수적이다(DeCesare, 등, 1995)

이 같은 다양한 효소들의 발현에는 여러가지 기전이 관여하며 섬유모세포에서는 종양세포 기원의 성장인자들이 stromelysin-2, stromelysin-3, 제4형 교원분해효소의 합성에 영향을 미친다. 구강암에서 이들 효소의 합성증가는 기질에서의 영향보다는 중

양세포에서의 영향이 클 것으로 보인다. 유전자 증폭(gene amplification)이 나타나는 경우는 드물며 전사체(transcript)의 안정화가 더 큰 역할을 하는 것으로 생각된다. 이것은 몇 예의 실험적 종양에서 mRNA가 안정화 되는 것이 확인이 되었으며 3' 부위에 불안정성을 조절하는 부위가 존재한다는 점 등과 관련이 있다. MMP-2의 전사체는 TGF- β 에 의해 안정화 된다. 현재의 연구들은 이 같은 효소가 어떤 종양세포기원의 성장인자에 의해서 활성화 되는지를 확인하는 데 집중되어 있다. 이 같은 연구를 통해 두경부 종양의 침습성을 억제하고 생존율을 향상시킬 수 있는 약물의 개발이 이루어 질 것으로 기대된다.

세포부착분자 Cell Adhesion Molecules

세포와 세포 또는 세포와 기질간의 상호작용을 매개하는 물질로 다양한 생리적 또는 병적현상에 관여한다. 여기에는 발생, 성장, 조직형상성의 유지,

면역반응, 창상치유, 종양 등이 있다. 세포의 부착분자는 매우 다양한 종류가 존재하는데 현재 가장 주목을 받고있는 것은 integrin 이다. 이 integrin 은 α 와 β subunit가 non-covalent bond로 heterodimer 구조를 이루고 있는 음이온 성 세포막 부착분자이다. 이들은 세포와 세포, 세포와 기질간의 상호반응을 매개하며, 특히 세포외기질과 세포내골격 간의 구조적, 기능적 가교를 형성하여 세포의 부착, 증식, 이동, 침습 등을 촉진한다. 이 같은 integrin 발현의 변화가 종양의 침습과 전이 시에 관찰된다.

integrin은 큰 세포외 domain, 세포막투과 domain, 짧은 세포내 domain으로 구성된 당단백질이며 세포질내의 domain은 actin cytoskeleton, protein kinases같은 신호전달 단백질, ca rufgkq 단백질등과 연결되어 있다. α (120-180 kD), β (90-110kD) subunit 는 각각 16개의 (와 8개 (subunit 로 구성되며 이들의 조합은 20가지 이상의 heterodimers를 형성한다.