

신세포암종에서 Matrix Metalloproteinase-9 발현의 분석

김지윤 · 박동춘

영남대학교 의과대학 비뇨기과학교실

Analysis of Matrix Metalloproteinase-9 Expression in Renal Cell Carcinoma

Ji Yoon Kim, Tong Choon Park

*Department of Urology,
College of Medicine, Yeungnam University, Daegu, Korea*

—Abstract—

Background: Matrix metalloproteinases (MMPs) are involved in the degradation of the extracellular matrix, which is an important step in tumor invasion and metastasis. A positive correlation between the expression of MMP-9 and aggressive behavior of renal cell carcinomas (RCCs) has been reported. MMP-9 expression in RCCs and adjacent normal kidney tissues were examined in this study.

Materials and Methods: Twenty-five patients pathologically diagnosed as clear cell RCCs, from specimens obtained at radical nephrectomy, between May 2003 and December 2004 were enrolled in this study. MMP-9 activity was estimated using gelatin zymography, and quantified using a laser densitometer. The results were compared with clinicopathological characteristics.

Results: The expression of MMP-9 was significantly elevated in the RCC compared with non-tumor kidney specimens ($p < 0.01$). The levels of MMP-9 expression in the RCC patients with large tumors (> 4 cm) or vascular invasion were significantly higher than in those without these clinical manifestations ($p < 0.01$). There were also significant differences in the expression of MMP-9 among T stages ($p < 0.01$). The tissue MMP-9 level was the highest in nuclear grade 4, but there was no statistical significance between the histological grades ($p = 0.17$).

Conclusions: These results suggest that enhanced MMP-9 expression contributes to carcinogenesis and tumor progression in the later stages of RCC.

Key Words: Matrix metalloproteinases, Renal cell carcinoma

서 론

신세포암종의 유병률과 사망률은 지난 20년간 꾸준히 증가되어 왔으며 성인에서 발생하는 악성 종양의 3%, 신에서 발생하는 암의 85%를 차지한다. 신세포암종 환자의 20~50% 정도에서 진단 시 이미 원격전이가 있으며, 이 경우 예후가 불량하여 적절한 치료에도 불구하고 대부분 1년 이내에 사망하고 5년 생존율이 0~20%에 불과하다.¹⁾ 그러나 최근에는 일반인들의 건강에 대한 관심증가와 초음파와 전산화 단층촬영 등과 같은 진단방법의 발전으로 조기에 진단되는 신장암이 늘고 있다. 그럼에도 불구하고, 국소성 신세포암 환자에서도 근치적 신적출술 후 약 30%에서 재발 또는 전이가 발생하므로²⁾ 이러한 빈도를 낮추기 위해 수술 전후에 예후인자를 확인하고자 하는 연구가 진행되고 있다.

신세포암종 수술 후 생존율을 예측할 때 여러 인자가 고려되지만 병리학적인 병기, 핵분화도, 조직학적 유형 등이 독립된 예후인자로 입증되었다.³⁾ 최근에는 종양세포의 분자생물학적 연구로 암의 침윤과 전이과정에 대한 연구가 있다. 암세포가 침윤하는 과정에는 첫 단계로 제 4형 collagen으로 구성된 기저막 파괴가 필수적인데 이와 같은 단백질 분해 과정에는 기저막 단백질 분해효소(matrix metalloproteinases; MMPs)들이 매우 중요한 역할을 하고 있다.⁴⁻⁶⁾ MMP는 세포외기질 성분을 선택적으로 파괴하는

Zn 의존성 endopeptidase로 적어도 interstitial collagenases, stromelysins, gelatinases, membrane type MMP 등 네 군으로 분류된다.⁷⁾ 현재 23 종류의 MMPs가 밝혀져 있는데 이중 MMP-2 (gelatinase A), MMP-7(matrilysin)과 MMP-9 (gelatinase B)이 제 4형 및 5형 collagen에 특이적으로 작용하며, gelatinase 발현정도가 암의 전이능력과 밀접한 관련이 있다.⁸⁾ 특히, MMP-9이 제 4형 collagen을 주로 분해하며 신세포암종에서 발현이 증가된다.

최근 여러 종양에서 단백질 분해효소의 분비와 암의 악성도에 대한 연구가 이루어져 왔으며, 이를 신세포암 환자의 예후 측정인자로 사용하려는 시도가 진행되고 있다.

이에 저자들은 향후 신세포암종 환자들의 예후를 예측하고 치료방침을 결정하는데 도움을 얻고자 제 4형 collagenase 중 대표적인 MMP-9의 발현정도를 정상 신조직과 신세포암종 조직에서 비교하였고, 또 암의 침윤 및 전이정도와 의 관계와 다른 임상적 인자들과의 상관성을 분석하여 암의 단계적 진행과정에서의 MMP-9의 발현변화에 대하여 조사하였다.

대상 및 방법

1. 대상

2003년 5월부터 2004년 12월까지 근치적 신적출술을 시행받고 병리학적으로 투명형(clear cell type)의 신세포암종으로 확진된 25명의 환

Table 1. Patient characteristics

	No. of patients
Age (years)	
<50	3
≥50	22
Sex	
Male	18
Female	7
Fuhrman grade	
Grade 1	3
Grade 2	9
Grade 3	7
Grade 4	6
T stage	
T1	17
T2	6
T3	2
T4	0

자조직을 대상으로 하였다. 수술 시 암조직과 원위부의 정상 신조직을 취하여 일부는 실험에 이용될 때까지 -70℃에 보관하여 실험재료로 사용하였으며 나머지 조직은 파라핀에 고정하였다. 신세포암군에서 병기는 2002년에 개정된 TNM staging⁹⁾을 기준으로 나누었고, 암의 분화도(grade)는 Fuhrman 분류법¹⁰⁾을 이용하였다.

2. 조직 검체

수술 시 획득한 신세포암종 조직과 원위부의 정상 신조직을 잘게 잘라 단백분해완충용액(protein lysis buffer solution)에 넣고 homogenizer로 균질화한 후, 13,000 rpm에서 15분간 원심분리하여 단백질이 용해된 상층액을 취하였다. 전체 단백질은 Bradford 정량방법을 사용하여 각각의 표본에서 동일한 양의 단백질을 추출하여 실험에 이용하였다.

3. Zymography

MMPs의 역할 및 발현의 변화를 확인하고자 정상 및 암 조직의 세포질에 대한 zymography를 시행하였다. 각각의 표본을 0.1% gelatin이 포함된 10% polyacrylamide gel을 사용하여 전기영동으로 분리하였다. Gel을 25% Triton X-100 용액인 renaturing buffer로 실온에서 30분간 세척한 다음 30분간 activation buffer에서 반응시킨 후 다시 37℃의 신선한 developing buffer에서 15시간 이상 반응시켰다. 그 후 2% brilliant blue, 50% ethanol, 10% acetic acid 용액에 담구어 1시간 염색시킨 후 30% methanol, 10% acetic acid 용액에서 30분간 탈색시키고 증류수에서 고정시켜 2020 Ultrascan Laser Densitometer(LKB, Sweden)로 각각의 lytic band의 밀도를 측정하였다. 이때 MMPs marker로 HT1080 세포주 배양에서 추출한 conditioned media를 92 kD의 표지자로 사용하였다.

4. 임상양상의 통계학적 분석

신세포암종 조직과 정상 신조직에서의 MMPs

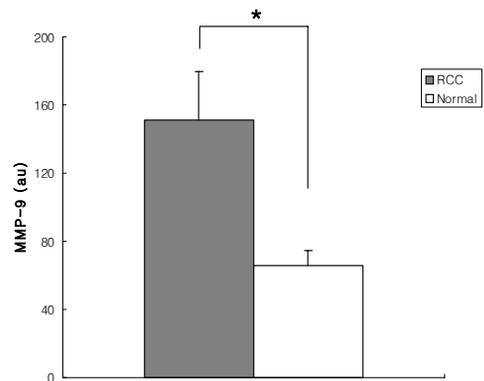


Fig. 1. Expression of MMP-9 in RCC and normal kidney. The expression of MMP-9 was significantly elevated in the RCC compared with normal kidney ($p < 0.01$). *: $p < 0.01$ compared with control values; Mann-Whitney test. Au: arbitrary units.

의 발현율을 비교하였으며, 신세포암종 조직에서의 MMPs의 발현율을 종양의 크기, 조직학적 분화도, 종양의 병기에 따라 분석하였다. 실험결과는 평균 ± 표준편차로 표시하였고, Student's t-test, ANOVA 및 Mann-Whitney test로 검정하여 p-value가 0.05 미만인 경우에 통계적 유의성이 있는 것으로 하였다.

결 과

대상환자는 총 25명으로 남자 18명, 여자 7명이었고 평균연령은 55±11.3세였으며 환자의 임상적 특성은 Table 1과 같다. 신세포암종과 정상 신조직 모두에서 pro-MMPs만 발현이 되었다.

1. 신세포암종과 정상 신조직의 MMPs의 발현

신세포암종과 정상 신조직간의 MMP-9 (92

kD) 발현과 활성을 비교분석하였다. 비교분석을 위하여 densitometer로 측정하였을 때, 신세포암종에서는 151.2±28.5, 정상 신조직에서는 65.8±8.5로 신세포암종 조직에서 통계적으로 유의있게 높았다(Fig. 1).

2. 신세포암종의 크기와 MMP-9의 발현

신세포암종의 크기와 MMP-9과의 발현을 비교 분석하기 위해 암종의 크기를 4 cm 미만군, 4 cm 이상인 군으로 분류하였다. 4 cm 미만인 군은 12명으로 MMP-9의 발현은 112.7±23.4이었고 4 cm 이상인 군은 13명이었고 MMP-9의 발현은 165.2±24.6으로 암종의 크기가 큰 군에서 유의하게 높았다(Table 2).

3. 혈관의 침범유무와 MMP-9의 발현

조직학적 검사상 혈관의 침범이 있었던 군

Table 2. Correlation between clinicopathologic factors and expression of MMP-9

Factor	No. of patients	MMP-9	p-value
Tumor size			
<4 cm	12	112.7±23.4	<0.01 *
≥4 cm	13	165.2±24.6	
Vessel invasion			
Negative	21	138.5±17.1	<0.01 *
Positive	4	180.3±6.8	
Fuhrman grade			
Grade 1	3	102±10.5	0.17†
Grade 2	9	127±20.8	
Grade 3	7	140±25.2	
Grade 4	6	157±18.0	
T stage			
T1	17	118.4±20.5	<0.01†
T2	6	158.3±10.8	
T3	2	184.7±5.4	
T4	0		

Values are mean ± SD, * Student's t-test, † ANOVA test

All values are in arbitrary units.

과 없었던 군 간 MMP-9의 발현을 비교한 결과 침범이 있는 경우가 총 4예였고 MMP-9의 발현은 180.3 ± 6.8 이었으며 혈관침범이 없는 군은 총 21예로 MMP-9의 발현은 138.5 ± 17.1 이었다. 혈관침범이 있는 군에서 혈관침범이 없는 군에 비해 MMP-9의 발현은 통계적으로 유의하게 높았다(Table 2).

4. 조직의 분화도와 MMP-9의 발현

종양의 Fuhrman 병리조직학적 분화도에 따른 MMP-9의 발현은 분화도가 좋은 G1에서는 102 ± 10.5 이었고 분화도가 중등도인 G2는 127 ± 20.8 , G3는 140 ± 25.2 이었으며 분화도가 나쁜 G4인 경우 MMP-9의 발현은 157 ± 18.0 이었다. 병리조직학적 분화도가 높을수록 MMP-9의 발현도 증가하였으나 통계학적인 유의성은 없었다(Table 2).

5. 종양의 T병기와 MMP-9의 발현

신세포암종의 T병기를 1기, 2기, 3기, 4기로

나누고 이에 따른 MMP-9의 발현을 비교분석한 결과 1기에 해당하는 환자는 17명이었고 발현은 118.4 ± 20.5 , 2기는 6명이었고 발현은 158.3 ± 10.8 , 3기는 2명이었고 발현은 184.7 ± 5.4 이었다. 4기에 포함되는 대상은 없었다. 통계적 결과 병기가 올라갈수록 MMP-9의 발현 증가는 유의하게 높았다(Table 2).

고 찰

본 연구에서 정상 신조직에 비해 신세포암종에서 MMP-9의 발현이 증가하였음을 제시하였다. 이는 신세포암종에서 MMP-9의 발현이 증가한다는 Kugler 등¹¹⁾과 Lein 등¹²⁾의 결과와 일치한다.

신세포암종의 20~30%는 진단 시 전이성암으로 발견되고, 임상적으로 신장 내에 국한된 국소암으로 근치적 수술을 받는 환자의 20~30%는 술 후 추적관찰 중 전이 또는 재발이 발견된다.¹³⁾ 이러한 전이성신세포암종의 평균 생존기간은 1년 미만이며, 3년 무병 생존율은 5% 미만이다.¹⁴⁾ 무엇보다도 수술적 절제가 가능한 신세포암종을 조기에 진단하는 것이 중요하지만 절제 가능한 신세포암종 환자에 있어 술후 재발의 예방과 재발된 경우 효과적인 치료방법의 개발이 필요하다. 최근까지 이를 예측할 수 있는 독립적인 예후인자들로 병리학적인 병기, 핵분화도, 세포아형 등이 알려져 있다.³⁾ 이러한 예후인자들은 대부분 종양의 병리학적 진단에 근거하므로 술 전 예측에 한계가 있다. 그리하여 신세포암종의 예후 예측에 있어 분자생물학적인 인자에 관한 연구가 활발히 이루어지고 있다.

종양세포가 침윤 혹은 전이하는 기전은 매

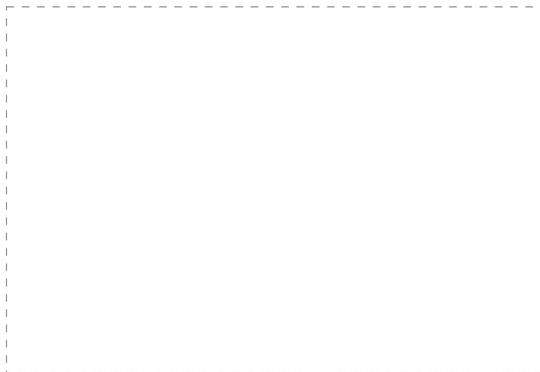


Fig. 2. Gelatin zymography for MMP-9. Normal kidney tissues (N1 and N2) show faint reaction bands for pro-MMP-9. Tumor samples of RCC (T1 and T2) show apparent gelatinolytic activity of pro-MMP-9. MMP: matrix metalloproteinase, RCC: renal cell carcinoma.

우 복잡한 생화학적, 세포 생물학적 과정을 거치게 되는데 이 중 종양세포가 단백분해효소를 분비하여 기저막을 분해하는 과정이 가장 중요한 첫 단계이다. 따라서 기저막 또는 세포외기질 등을 구성하는 단백질의 분해가 종양의 침윤 및 전이를 결정하는 중요한 요소가 된다. 최근 들어 이와 같이 기존의 혈관 기저막을 용해시켜 내피세포의 이동을 유발시키는 단백분해효소의 역할이 주목받기 시작하였다.¹⁵⁻¹⁹⁾

전이능이 있는 암세포는 기저막에 부착시 용해구역을 형성한 뒤 기저막을 분해시킨다. 이와 같은 기저막 파괴에는 여러종류의 단백분해효소들이 관여하며, 그 중에서도 MMPs는 결합조직의 단백을 파괴하여 암의 전이를 유발할 뿐만 아니라, 정상조직의 증식 발달, 조직재생 및 상처치유에도 중요한 역할을 한다.²⁰⁻²²⁾

MMPs는 세포외 기질을 용해하는 효소로서 일반적으로 암세포에서 발현이 증가되는데 특히 암과 정상조직과의 경계 부위에서 많이 발현된다.⁵⁾ 암의 전이와 관련하여 처음에는 주로 기저막 용해 등 혈관 외 유출(extravasation)에 관여하는 것으로 생각되었으나, 최근에는 일차성 및 전이성 종양의 증식 및 혈관생성에 직접 관여하여 전이에 미치는 영향이 광범위하다.²³⁾ MMP군은 세포외 기질의 다양한 구성요소의 단백분해에 중요한 역할을 하며 MMP-2와 MMP-9은 기저막의 주요 구성요소인 제 4형 collagen의 변성을 일으킨다. 이들 효소의 생산은 결합조직 뿐만 아니라 암조직에서도 생성이 된다.^{24, 25)}

본 연구 결과 신세포암종의 크기에 따른 MMP-9의 발현은 종양의 크기가 4cm 이상인 군에서 그리고 혈관침범이 있는 군에서 의미 있는 증가를 보였다. 신세포암종의 병기와 MMP-9의

발현 사이의 비교에서도 통계적으로 유의하였는데, 이는 종양이 크고 혈관침범이 있는 경우 병기가 증가하는 것과 일치한다. 따라서 MMP-9의 발현율이 높은 군에서 예후가 더 나쁠 것으로 예견된다. 조직학적 분화도와 MMP-9의 발현율과의 비교에서도 유의한 차이를 확인할 수 있었는데 이는 MMP-9가 기저막 침습 이전에 뿐만 아니라 조직의 분화도에도 관여있음을 의미한다.

신세포암종의 경우 현재 진단과 예후판정에 가치 있는 뚜렷한 종양표지가 없는 상태이다. 앞서 언급한 바와 같이 신세포암종 환자의 예후는 병기와 가장 관련이 높으며 다음으로 핵분화도 및 종양의 크기가 중요한 것으로 알려져 있지만, 술 전에 예후를 예측하는데는 한계가 있다. 그밖에 술 전 측정이 가능한 erythropoietin, ferritin, c-reactive protein(CRP), p-53, fibrinogen 및 vimentin 등을 예후 인자로 사용하려는 시도가 있었으나 결과는 제한적이었다. 본 연구에서 종양의 병기가 높을수록 MMP-9의 발현도 증가되는 것으로 보아, 높은 MMP-9의 발현은 재발과 전이의 불량한 예후를 시사하는 것으로 생각한다. Zeng 등²⁶⁾은 높은 병기의 대장암군에서 MMP-9 mRNA 발현이 증가됨을 보고하였으며, Sier 등²⁷⁾은 불량한 예후를 보인 위암환자에서 MMP-2와 MMP-9이 과발현됨을 증명하여, 비록 종양 발생부위는 다르지만 종양의 진행과 MMPs의 발현에 유의한 상관관계가 있음을 알 수 있다. 신세포암종에 대한 뚜렷한 종양표지자가 없는 현재 상황을 고려할 때, 본 연구의 결과는 신세포암종 조직에서 MMP-9의 측정이 유용한 종양표지자로서의 가능성을 갖고 있음을 의미한다. 그러나, 이를 임상에 적용하여 술 전 예후 예측인자로 사용하기 위해서

는 혈청이나 소변을 대상으로 하는 부가적인 연구결과가 뒷받침 되어야 할 것으로 생각된다.

요 약

최근 여러 종양에서 단백분해효소의 분비와 암의 악성도에 대한 연구가 이루어져 왔으며, 이를 신세포암종 환자의 예후 측정인자로 사용하려는 시도가 진행되고 있다. 이에 저자들은 제 4형 collagenase 중 대표적인 MMP-9의 발현정도를 정상 신조직과 신세포암종 조직에서 비교하였고, 또 암의 침윤 및 전이 정도와의 관계와 다른 임상적 인자들과의 상관성을 분석하여 암의 단계적 진행과정에서의 MMP-9의 발현변화에 대하여 조사하였다. 그 결과 정상 신조직에 비해 신세포암종 조직에서 MMP-9의 발현이 증가되며 암의 크기가 크고 혈관침범이 있으며 병기가 높을수록 MMP-9의 발현이 증가됨을 관찰할 수 있었다. 이는 MMP-9 발현의 증가가 신세포암종의 발생과정 및 암의 후기 진행에 관여함을 시사하므로 향후 신세포암종의 예후척도로 사용되어 치료방침을 결정하는데 도움을 줄 수 있을 것으로 생각한다.

참 고 문 헌

1. Linehan WM, Zbar B, Bates SE, Zelefsky MJ, Yang JC. Cancer of the kidney and ureter. In: Devita VT, Hellman S, Rosenberg SA, editors. Cancer: principles and practice of oncology. 6th ed. Philadelphia: Lippincott; 2001. p. 1362-95.
2. Rafla S. Renal cell carcinoma. Natural history and results of treatment. Cancer 1970 Jan; 25(1):26-40.
3. Ficarra V, Righetti R, Piloni S, D'amico A,

- Maffei N, Novella G, et al. Prognostic factors in patients with renal cell carcinoma: retrospective analysis of 675 cases. Eur Urol 2002 Feb; 41(2):190-8.
4. Curran S, Murray GI. Matrix metalloproteinases: molecular aspects of their roles in tumour invasion and metastasis. Eur J Cancer 2000 Aug;36(13):1621-30.
5. Murray GI. Matrix metalloproteinases: a multifunctional group of molecules. J Pathol 2001 Sep;195(2):135-7.
6. Tryggvason K, Hoyhtya M, Pyke C. Type IV collagenases in invasive tumors. Breast Cancer Res Treat 1993;24(3):209-18.
7. Nagase H, Woessner JF Jr. Matrix metalloproteinases. J Biol Chem 1999 Jul 30;274(31): 21491-4.
8. Jiang Y, Goldberg ID, Shi YE. Complex roles of tissue inhibitors of metalloproteinases in cancer. Oncogene 2002 Mar 28;21(14):2245-52.
9. Sobin LH, Wittekind CH. TNM Classification of Malignant Tumours: UICC International Union Against Cancer. 6th ed. New York: Wiley-Liss; 2003. p.193.
10. Fuhrman SA, Lasky LC, Limas C. Prognostic significance of morphologic parameters in renal cell carcinoma. Am J Surg Pathol 1982 Oct;6(7):655-63.
11. Kugler A, Hemmerlein B, Thelen P, Kallerhoff M, Radzun HJ, Ringert RH. Expression of metalloproteinase 2 and 9 and their inhibitors in renal cell carcinoma. J Urol 1998 Nov;160 (5):1914-8.
12. Lein M, Jung K, Laube C, Hubner T, Winkelmann B, Stephan C, et al. Matrix-metalloproteinases and their inhibitors in plasma and tumor tissues of patients with renal cell carcinoma. Int J Cancer 2000 Mar 15;85(6):801-4.
13. Motzer RJ, Russo P. Systemic therapy for renal cell carcinoma. J Urol 2000 Feb;163(2):

- 408–17.
14. Figlin RA. Renal cell carcinoma: management of advanced disease. *J Urol* 1999 Feb;161(2): 381–6.
 15. Liotta LA. Tumor invasion and metastases–role of the extracellular matrix: Rhoads Memorial Award lecture. *Cancer Res* 1986 Jan;46(1):1–7.
 16. Nakajima M, Welch DR, Belloni PN, Nicolson GL. Degradation of basement membrane type IV collagen and lung subendothelial matrix by rat mammary adenocarcinoma cell clones of differing metastatic potentials. *Cancer Res* 1987 Sep 15;47(18):4869–76.
 17. Tryggvason K, Hoyhtya M, Salo T. Proteolytic degradation of extracellular matrix in tumor invasion. *Biochim Biophys Acta* 1987 Nov 25;907(3):191–217.
 18. Collier IE, Wilhelm SM, Eisen AZ, Marmor BL, Grant GA, Seltzer JL, et al. H-ras oncogene–transformed human bronchial epithelial cells (TBE-1) secrete a single metalloprotease capable of degrading basement membrane collagen. *J Biol Chem* 1988 May 15;263(14): 6579–87.
 19. Nicolson GL. Metastatic tumor cell interactions with endothelium, basement membrane and tissue. *Curr Opin Cell Biol* 1989 Oct;1(5):1009–19.
 20. Sato H, Takino T, Okada Y, Cao J, Shinagawa A, Yamamoto E, et al. A matrix metalloproteinase expressed on the surface of invasive tumour cells. *Nature* 1994 Jul 7;370(6484):61–5.
 21. Kleiner DE, Stetler–Stevenson WG. Quantitative zymography: detection of picogram quantities of gelatinases. *Anal Biochem* 1994 May 1;218 (2):325–9.
 22. Kleiner DE, Stetler–Stevenson WG. Matrix metalloproteinases and metastasis. *Cancer Chemother Pharmacol* 1999;43(Suppl):S42–51
 23. Arai S, Mise M, Harada T, Furutani M, Ishigami S, Niwano M, et al. Overexpression of matrix metalloproteinase 9 gene in hepatocellular carcinoma with invasive potential. *Hepatology* 1996 Aug;24(2):316–22.
 24. Sato H, Kida Y, Mai M, Endo Y, Sasaki T, Tanaka J, et al. Expression of genes encoding type IV collagen–degrading metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in various human tumor cells. *Oncogene* 1992 Jan;7(1):77–83.
 25. Rao JS, Steck PA, Mohanam S, Stetler–Stevenson WG, Liotta LA, Sawaya R. Elevated levels of M(r) 92,000 type IV collagenase in human brain tumors. *Cancer Res* 1993 May 15;53(10 Suppl):2208–11.
 26. Zeng ZS, Huang Y, Cohen AM, Guillem JG. Prediction of colorectal cancer relapse and survival via tissue RNA levels of matrix metalloproteinase–9. *J Clin Oncol* 1996 Dec; 14(12):3133–40.
 27. Sier CF, Kubben FJ, Ganesh S, Heerding MM, Griffioen G, Hanemaaijer R, et al. Tissue levels of matrix metalloproteinases MMP-2 and MMP-9 are related to the overall survival of patients with gastric carcinoma. *Br J Cancer* 1996 Aug;74(3):413–7.
-