J Korean Gastric Cancer Assoc
2001;1(2):83-91

□ 원 저 □

위상피이형성과 위암종에서 FasL의 발현 및 Apoptosis에 관한 연구

동아대학교 의과대학 내과학교실, [1]해부병리학교실

박건욱 · 한상영 · 이종훈 · 금동주 · 노명환 · 최석렬 · 김종성 · 노미숙[1]

Study of the Expression of FasL and of Apoptosis in Gastric Epithelial Dysplasia and Gastric Adenocarcinomas

Gun Uk Park, M.D., **Sang Young Han**, M.D., **Jong Hun Lee**, M.D., **Dong Joo Keum**, M.D., **Myung Hwan Roh**, M.D., **Seok Ryeol Choi**, M.D., **Jong Seong Kim**, M.D. and **Mee Sook Roh**, M.D.[1]

Departments of Internal Medicine and [1]Anatomic Pathology, Dong-A University Medical School, Busan, Korea

Purpose: This study was to observe whether the apoptotic function of tumor-infiltrating lymphocytes (TIL) is induced in human gastric epithelial dysplasia and gastric adenocarcinoma according to the role of FasL expression.
Materials and Methods: A total of 56 gastric epithelial dysplasia and gastric adenocarcinoma patients were enrolled in this study: 9 cases of gastric epithelial dysplasia, 18 cases of early gastric carcinomas (EGC) and 29 cases of advanced gastric carcinomas (AGC). Immunohistochemical staining was performed for FasL and CD45, and the terminal deoxynucleotidyl transferase mediated dUTP nick end labelling (TUNEL) method was used to detect cell death in tumor-infiltrating lymphocytes.
Results: 1) Positive reactions of FasL to neoplastic cells were 88.9% (8/9) in gastric epithelial dysplasia, 83.3% (15/18) in EGC, and 75.9% (22/29) in AGC. 2) Expression of TIL was decreased in the FasL positive region and was increased in the FasL negative region, and significant expression of TIL was observed in the AGC group (P=0.001). 3) Expression of apoptotic TIL was very similar to the FasL expression, and 100% expression was observed in gastric epithelial dysplasia group. 4) Expression of apoptotic TIL was increased in the FasL positive region and decreased in the FasL negative region, and significant apoptotic expression was observed in the gastric epithelial dysplasia and EGC groups (P=0.0420, P=0.0263, respectively).
Conclusion: These results suggest that FasL is a prevalent mediator of immune privilege in epithelial dysplasia and cancer of the stomach. **(J Korean Gastric Cancer Assoc 2001;1:83-91)**

Key Words: Tumor infiltrating lymphocyte, Apoptotic tumor infiltrating lymphocyte, FasL, Gastric epithelial dysplasia, Gastric cancer
중심 단어: 종양 침윤 림프구, 고사성 종양 침윤 림프구, FasL, 위상피이형성, 위암

서 론

세포사멸(apoptosis, programmed cell death)은 1972년 Kerr등(1)에 의해 처음 주장되었는데 DNA의 분쇄, 세포의 수축, endoplasmic reticulum의 확장 등에 의해 세포자살이 유도되어 사멸되고 세포 괴사(necrosis)와는 달리 정상세포 변환과정의 중요한 부분을 차지하며, 더 이상 쓸모가 없는 세포들을 신속하게 제거해 주는 중요한 기전 중의 하나이다. 사멸이 진행되고 있는 세포는 괴사와는 달리 크기가 작고 chromatin과 세포질 내의 소기관이 농축되어 막에 둘러싸인 사멸체를 형성하여 주위의 세포에 의해 신속하게 제거되어지며 원형질막은 파괴되지 않으므로 세포 내 물질이 유출되지 않아 염증 반응을 일으키지는 않는다.(2) 정상 상태의 조직에서는 세포의 증식과 사멸간에 일정한 평형상태가 되어 항상성을 유지하지만 세포의 증식력이 왕성해 지거나 사멸력이 감소하게 되면 세포의 수적 평형상태가 깨어져 세포수의 증가에 의한 종양형성을 초래할 수 있다.(3) 하지만 일반적으로 발암 과정에는 여러 가지 복합적인 요소들이 관여하는데 세포의 증식과 성장을 조장하는 유전자와 억제하는 종양 억제 유전자, 그리고 고사를 조절하는 유전자 등이 여기에 속한다. 최근에 각종 암의 발생 또는 소멸과정에 숙주의 면역체계가 중요한 결정인자로 관여하며 면역구에 의한 종양세포의 고사는 암의 발생 및 소멸 그리고 진행에 큰 영향을 미친다고 알려져 종양 침윤 림프구에 의한 종양 세포와의 상호 관계에 관한 연구가 활발하게 진행 중이나 그 과정 및

책임저자 : 한상영, 부산시 서구 동대신동 3가 1번지
동아대학교병원 내시경실, 602-715
Tel: 051-240-5625, Fax: 051-242-5852
E-mail: syhan@daunet.donga.ac.kr
접수일 : 2000년 12월 1일, 게재승인일 : 2001년 1월 31일

기전에 대해서는 아직 의견이 정립되지 않은 실정이다.(4,5)

최근에 밝혀진 FasL (Fas-ligand)은 제 II 형 막단백질로서 281개의 아미노산으로 구성되어 있으며 분자량이 약 40 kDa인데 TNF-α 및 lymphotoxin-β와 상당한 상동성을 가지며,(6) 주로 세포독성 T림프구에 발현되나 최근에는 호중구에서도 FasL이 발현되고 호중구의 autocrine death를 유발할 수 있다고 알려져 있다.(7) FasL 유전자는 약 8kbp의 크기로, 5개의 exon으로 구성되어 있으며, 염색체 1q23에 위치하여(8) 정상적인 면역계의 발달, 항상성 유지, 조절 및 기능에 중추적인 역할을 담당하는데, 이들은 감작된 세포의 표면에 있는 수용체 Fas (CD95)와 결합하여 고사의 기전을 일으킨다. Fas는 림프구 및 상피세포 등 기능적인 수용체를 가지고 있는 세포에서 사멸기전을 유도하며,(9) T림프구 수용체에 대한 보조자극 인자로도 작용한다는 사실이 알려져 있다.(10)

Fas/FasL의 상호 작용은 악성 림프종 및 자가면역성 질환 뿐만 아니라, 식도암 및 대장암과 같은 상피기원의 악성 종양에서도 숙주의 끊임없는 면역감시를 회피하는 과정에 관여한다는 사실이 알려져 있는데, 종양의 형성 및 진행 과정에 숙주의 면역기능이 억제자로서 작용한다는 기존의 잘 알려진 이론에 추가로 종양 세포에 의한 적극적인 면역구 파괴능력이 종양의 형성 및 진행 과정에 촉진제로 관여한다는 이론이다.(4) 이와 같은 종양의 면역감시회피를 위한 Fas 역공격(counterattack) 가설은 O'Connell 등(11)의 연구에서 밝혀졌으며, 악성 흑색종을 대상으로 한 in-vivo 연구에서는 악성종양세포가 면역구를 적극적으로 파괴하면서 증식할 수 있음을 Hahne등(12)이 최초로 밝혔고, 그 후 간세포암종, 폐암종, 성상 교세포종및 원발성 대장암과 간 전이성 대장암 등에 대한 연구에서도 이와 같은 현상이 in-vivo에서 초래될 수 있음을 밝혔다.(13) 그러나 종양 발현 FasL이 in-vivo 인체 암종 내에서 종양 침윤 림프구의 고사를 직접 유도한다는 증거를 완전히 제공해 주지는 못하였다. 그 후 식도암을 대상으로 종양 침윤 림프구의 정량적 변화를 연구하여 최초의 in-vivo 상태의 인체 암종의 FasL에 의한 종양 침윤 림프구의 고사 유도 현상을 증명한 Bennett등(5)은 기존의 T 세포가 FasL을 발현하여 Fas를 갖는 암세포의 고사를 유도한다는 사실뿐 만 아니라 이와는 반대로 암세포가 FasL을 발현하여 암세포 주위의 Fas를 발현하는 T림프구의 고사를 적극적으로 유도한다는 사실을 설명하였다. 국내에는 위암의 유병율이 높지만 Fas 매개 고사 관련 연구가 드문 실정이다.(14) 본 연구는 Bennett등(5)의 연구결과에 추가로 위암의 전구성 병변인 위상피이형성에서 종양 및 종양 침윤 림프구의 FasL 발현 정도 및 고사 정도를 관찰하여 종양 침윤 림프구의 고사와 FasL 발현간의 상관 관계를 파악하며, 종양 침윤 림프구의 수적 변화가 종양으로의 진행상태에 어떤 영향을 미치는가를 분석하였다. 또한 위암 전구성 병변에서 위암으로의 이행에 어떤 영향을 미치는가를 살펴보고, 아울러 위암에서도 조기위암과 진행위암을 분리하여 조직의 침습정도 및 조직학적 등급과 장형과 미만형에 따른 분석 등을 실시하여 그 생물학적 특성을 관찰하였다.

방 법

1) 연구 대상

본 연구의 대상은 1999년 1월부터 1999년 12월까지 1년간 동아대학교병원에서 위내시경 검사 후 조직생검을 실시하여 위상피이형성으로 병리적 진단이 된 9예와 같은 기간에 위절제술을 시행하여 조기 위암종(EGC)으로 진단된 18예, 그리고 동기간에 위절제술을 시행한 진행성 위암종(AGC) 29예 등 총 56예를 대상으로 하였다.

2) 연구 방법

(1) Fas Ligand의 면역조직화학적 염색 방법: 10% 중성 포르말린 용액에 고정하여 파라핀에 포맷한 조직에서 4μM 두께의 연속 절편 3장을 잘라 표면 처리된 3장의 슬라이드에 부착시켰다. 크실렌에서 파라핀을 제거한 후 100%, 90%, 80%, 70% 알코올에 1분씩 담가 함수시키고 증류수로 씻었다. 조직 표본의 전처치로 pH 6.0 citrate buffer에 담가 10분간 microwave에서 끓인 후 식히고 3% H_2O_2를 떨어뜨려 10분간 두어 내인성 peroxidase 활동을 저지시킨 후 TBS(Tris Buffered Saline) Tween 20 용액(Lab vision, Fremone, CA, USA)으로 실온에서 20분간 반응시킨 후 1 : 100으로 희석한 Fas Ligand/CD95L 항체(mouse anti-human FasL, Transduction Laboratories, KY, USA)와 40°C에서 하룻밤 동안 반응시켰다. TBS Tween 20 용액으로 10분간 씻은 후 2차 항체인 biotinylated second antibody (Histostain-Plus, Zymed, San Francisco, CA, USA)와 실온에서 15분간 반응시키고 TBS Tween 20 용액으로 10분간 씻은 후 HRP-streptavidine (Histostain-Plus, Zymed, San Francisco, CA, USA)와 15분간 반응시켰다. 다시 TBS Tween 20 용액으로 10분간 씻고 AEC (3-amino9-ethylcarbazole, Lab vision, Fremont, CA, USA)로 10분간 발색시킨 후 물로 세척하였다. Mayer's Hematoxylin으로 3분간 대조염색을 한 후 물로 씻고 crystal mount로 봉입하여 현미경으로 검경하였다.

① 면역조직화학적 염색의 판독 및 **FasL** 양성, **FasL** 음성 부위 선정; 염색된 위장 조직을 광학현미경에서 관찰하여 상피세포의 세포질이 적갈색으로 염색되면 양성 세포로 판정하였다. 침윤한 상피세포의 소군집 주에서 양성으로 염색된 부위가 1/3 이상인 경우 FasL 양성 세포군집으로 하였고, 전 상피세포가 FasL 음성인 소군집은 FasL 음성 세포군집으로 표시하였다.

(2) CD45의 면역조직화학적 염색: FasL와 같은 방법으로 염색을 시행하였으며 microwave 전처치 과정은 생략하였다. 이때 일차 항체는 1 : 100으로 희석한 mouse anti- human CD45 monoclonal antibody (Dako, CA, USA)를 사용하였다.

① 면역조직화학적 염색의 판독 및 종양 침윤 림프구 침윤 지수; 염색된 위장 조직을 광학현미경에서 관찰하여 림프구의 세포질이 적갈색으로 염색되면 양성 세포로 판정하였다. 종양 침윤 림프구의 침윤 정도(종양 침윤 림프구 침윤 지수)는 FasL 양성 종양 주위와 FasL 음성 종양 주위로 각각 나누어 평가하였는데, 이는 연속 절편한 슬라이드 3장을 각각 FasL 염색, CD45 염색, apoptosis 염색을 하여 FasL 양성과 FasL 음성 부위를 각각 표시한 후 CD45 염색 슬라이드 위에 겹쳐 FasL 양성과 FasL 음성 세포군집 주위 간질에 침윤해 있는 1,000개 이상의 세포 중 CD45 양성 림프구를 헤아려 백분율을 구해 종양 침윤 림프구 침윤 지수를 비교하였다.

(3) 세포사멸의 면역조직화학적 염색: ApopTag kit (Oncor, USA)를 사용하여 TUNEL 염색을 시행하였다. 크실렌에서 조직의 파라핀을 제거하고 PBS 용액으로 씻은 후 porteinase K를 실온에서 30분간 반응시키고 증류수로 수세하여 단백을 제거하였다. 내재성 peroxidase 활성을 저지시키기 위해 3% H_2O_2 용액에 5분간 반응시키고 PBS로 씻은 후 평형 완충액에 10분간 두었다. TdT와 완충액을 혼합한 working strength TdT를 검체에 덮고 37°C에서 10분간 담근 후 PBS 용액을 씻어내고 anti-digoxigenin-peroxidase를 이용하여 실온에서 30분간 반응시켰다. PBS 용액으로 씻은 후 AEC로 5분간 발색시킨 후 Mayer's hematoxylin으로 1분간 대조 염색하고 씻은 후 crystal mount로 봉입하여 현미경으로 관찰하였다.

① 면역조직화학적 염색의 판독 및 고사세포 지수; 염색된 위장 조직을 광학현미경에서 관찰하여 림프구의 핵이 적갈색으로 염색되고, 또 핵의 모양이 세포고사 때 보이는 형태를 나타낼 때 양성으로 판정하였다. 고사세포 지수는 FasL 양성 종양 주위와 FasL 음성 종양 주위로 나누어 평가하였는데, 종양 침윤 림프구 침윤 지수 계수 때와 같이 FasL 양성 종양 주위와 FasL 음성 종양 주위에서 CD45 양성 림프구 1,000개당 림프구의 고사세포 수의 백분율을 각각 구하여 비교하였다.

(4) 통계학적 처리: FasL의 면역조직화학적 염색정도에 따른 CD45의 발현정도와 apoptotic TIL (Tumor Infiltrating Lymphocyte)의 발현정도를 위상피이형성군, 조기 위암군 및 진행성 위암군으로 나누어 검토하고, 조직 침습정도 및 조직학적 등급에 따른 유의성을 알아보기 위해 Wilcoxon Signed Ranks를 이용한 통계학적 검증을 실시하였다. P 값이 0.05 미만일 경우를 의미 있는 값으로 간주하였다.

결 과

1) FasL의 발현과 종양 침윤 림프구와의 상관관계

(1) FasL은 위상피이형성군에서는 88.9%(8/9), 조기위암

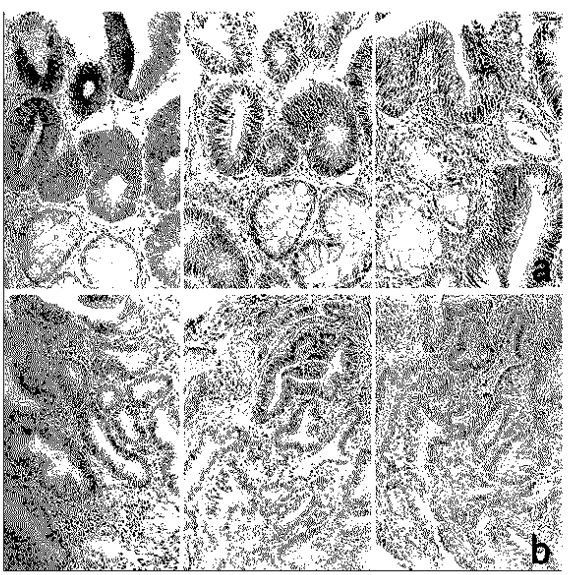

Fig. 1. (a) FasL positive region of gastric epithelial dysplasia (×200). Left; immunohistochemical staining for FasL, Middle; immunohistochemical staining for CD45 to evaluate TIL, Right; TUNEL staining for evaluation of apoptosis. (b) FasL negative region of gastric epithelial dysplasia (×200). Left; immunohistochemical staining for FasL, Middle; immunohistochemical staining for CD45 to evaluate TIL, Right; TUNEL staining for evaluation of apoptosis.

군의 경우는 83.3%(15/18)에서 종양세포 양성소견이 관찰되었고, 진행성 위암군의 경우는 75.9%(22/29)에서 종양세포 양성소견이 관찰되었는데, 종양 부위 모두에서 고르게 양성 반응을 보인 경우는 없고 부위에 따라 다양하게 염색이 되는 양상을 보였다(Fig. 1a, 1b).

(2) 종양세포의 FasL 발현과 종양 침윤 림프구의 수적변화는 특이성이 있었는데, FasL의 발현이 강한 종양 주변에는 종양 침윤 림프구의 수가 상대적으로 현저히 적으나, FasL의 발현이 없는 종양 주변에서는 종양 침윤 림프구의 수가 상대적으로 많게 나타났으며, 이를 위상피이형성군, 조기 위암군, 진행성 위암군 등 세 군으로 나누어 분석한 결과, 위상피이형성군과 조기위암군에서는 유의한 차이가 없었으나 진행성 위암군에서 FasL 양성 부위보다 FasL 음성 부위에서 종양침윤림프구의 발현이 유의하게 증가하였다(Table 1). 또한, 조기 위암군을 점막 침범군과 점막하 침범군으로, 진행성 위암군을 장형군과 미만형군으로 나누어 분석해 본 결과 진행성 위암군인 장형군과 미만형군 모두에서 FasL 양성 부위보다 FasL 음성 부위에서 종양침윤림프구의 발현이 유의하게 증가하였다(Table 2)(Fig. 3a, 3b).

종양 침윤 림프구의 발현 정도를 조직학적 분화도 및 조직 침습정도에 따라 관찰해 본 결과 역시 FasL의 발현이 없는 종양 주변에서 종양 침윤 림프구의 발현이 높게 관찰되었는데 조직학적 분화도에 따른 유의성은 없었으며, 조직 침습이 심한 위암군에서는 FasL 양성 부위보다 FasL 음성 부위에서 종양침윤림프구의 발현이 유의하게 증가하였다(Table 3, 4)(Fig. 2a, 2b).

2) FasL의 발현과 종양침윤 림프구 고사와의 관련성

(1) 세포고사의 발현정도는 조기 위암군 및 진행성 위암군에서의 FasL의 발현정도와 같았으며 위상피이형성군에서 더 높아 100%의 발현을 나타내었다.

(2) FasL 발현이 강한 종양 주변의 종양 침윤 림프구에서 많은 수의 고사세포가 관찰되었고 FasL 발현이 없는 종양 주변의 종양 침윤 림프구에서는 고사가 거의 관찰되지 않거나 소수만이 관찰되는 양상을 보였다. 특히 위상피이형성군과 조기 위암군에서 FasL 음성 부위보다 FasL 양성 부위에서 고사성 종양침윤림프구의 발현이 유의하게 증가하였다(Table 5)(Fig. 3a, 3b). 또 조기 위암군을 점막 침범군과 점막하 침범군으로, 진행성 위암군을 미만형과 장형군으로 나누어 분석해 본 결과 점막 침범군에서만 의미 있는 발현이 관찰되었다(Table 6). 고사세포의 발현

Table 1. Expression of TIL in FasL-positive versus FasL-negative regions of gastric epithelial dysplasia and gastric adenocarcinoma

	FasL-positive (% TIL*)	FasL-negative (% TIL)	Significance
Gastric epithelial dysplasia (n=9)	3.18	6.40	NS
EGC (n=18)	4.48	8.73	NS
AGC (n=29)	1.08	3.42	P=0.0001†

TIL = tumor infiltrating lymphocyte; EGC = early gastric carcinoma; AGC = advanced gastric carcinoma; NS = non-specific (P>0.05). *The % TIL was calculated as the CD45-positive cells per 1,000 total nuclei counted within FasL-positive/-negative tumor regions; † Wilcoxon Signed Ranks.

Table 2. Expression of TIL in FasL-positive versus FasL-negative regions of gastric epithelial dysplasia and detailed gastric adenocarcinoma

	FasL-positive (% TIL*)	FasL-negative (% TIL)	Significance
Gastric epithelial dysplasia (n=9)	3.18	6.40	NS
EGC (mucosa type)(n=10)	6.17	12.5	NS
EGC (submucosa type)(n=8)	3.00	3.44	NS
AGC (intestinal type)(n=14)	1.19	2.90	P=0.0038†
AGC (diffuse type)(n=15)	0.94	3.86	P=0.0001†

TIL = tumor infiltrating lymphocyte; EGC = early gastric carcinoma; AGC = advanced gastric carcinoma; NS = non-specific (P>0.05). *The % TIL was calculated as the CD45-positive cells per 1,000 total nuclei counted within FasL-positive/-negative tumor regions; † Wilcoxon Signed Ranks.

Table 3. Histologic analysis of TIL in FasL-positive versus FasL-negative regions of gastric epithelial dysplasia and gastric adenocarcinoma of intestinal type

	FasL-positive (% TIL*)	FasL-negative (% TIL)	Significance
Well differentiated (n=10)	3.98	8.74	NS
Moderate differentiated (n=9)	2.80	3.13	NS
Poorly differentiated (n=22)	2.62	6.21	NS

TIL = tumor infiltrating lymphocyte; NS = non-specific (P>0.05). *The % TIL was calculated as the CD45-positive cells per 1,000 total nuclei counted within FasL-positive/-negative tumor regions.

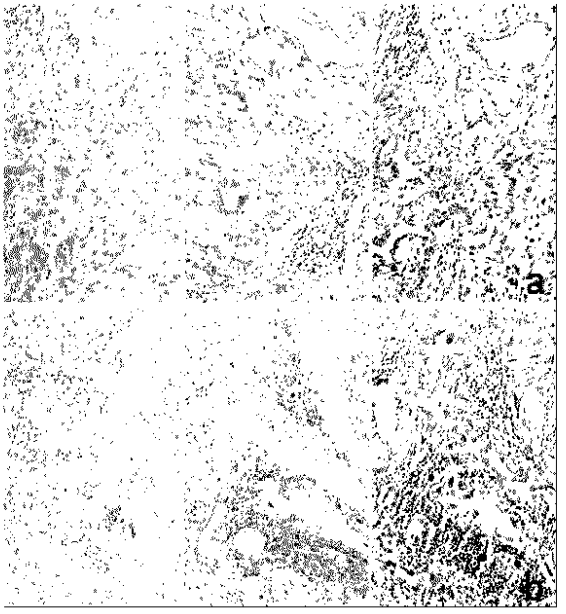

Fig. 2. (a) FasL positive region of intestinal type of advanced gastric adenocarcinoma (×200). Left; immunohistochemical staining for FasL, Middle; immunohistochemical staining for CD45 to evaluate TIL, Right; TUNEL staining for evaluation of apoptosis. (b) FasL negative region of intestinal type of advanced gastric adenocarcinoma (×200). Left; immunohistochemical staining for FasL, Middle; immunohistochemical staining for CD45 to evaluate TIL, Right; TUNEL staining for evaluation of apoptosis.

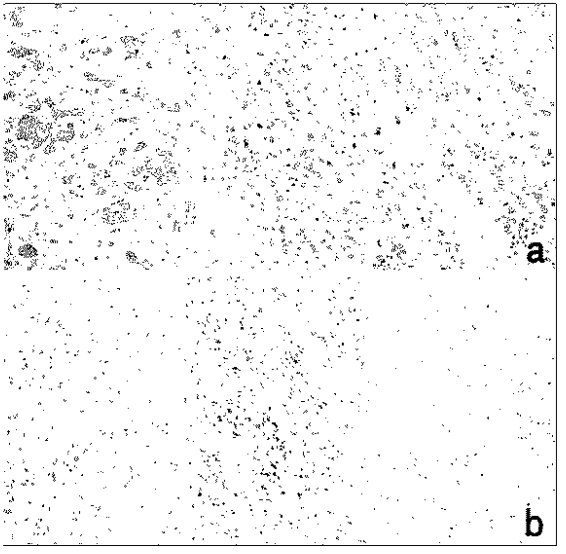

Fig. 3. (a) FasL positive region of diffuse type of advanced gastric adenocarcinoma (×200). Left; immunohistochemical staining for FasL, Middle; immunohistochemical staining for CD 45 to evaluate TIL, Right; TUNEL staining for evaluation of apoptosis. (b) FasL negative region of diffuse type of advanced gastric adenocarcinoma (×200). Left; immunohistochemical staining for FasL, Middle; immunohistochemical staining for CD45 to evaluate TIL, Right; TUNEL staining for evaluation of apoptosis.

Table 4. Analysis of TIL in FasL-positive versus FasL-negative regions of gastric adenocarcinoma according to depth of invasion

	FasL-positive (% TIL*)	FasL-negative (% TIL)	Significance
T1 (n=18)	4.48	8.73	NS
T2 (n=6)	1.48	3.17	NS
T3 (n=18)	1.04	3.81	P=0.0001†
T4 (n=5)	0.65	2.45	P=0.0284†

T_1 = mucosa and submucosa; T_2 = proper muscle and subserosa; T_3 = serosa; T_4 = beyond serosa; NS = non-specific ($P>0.05$). *The % TIL was calculated as the CD45-positive cells per 1,000 total nuclei counted within FasL-positive/-negative tumor regions; † Wilcoxon Signed Ranks.

Table 5. TIL apoptosis in FasL-positive versus FasL-negative regions of gastric epithelial dysplasia and gastric adenocarcinoma

	FasL-positive (% apoptotic TIL*)	FasL-negative (% apoptotic TIL)	Significance
Gastric epithelial dysplasia (n=9)	5.54	2.93	p=0.0420†
EGC (n=18)	10.93	4.11	P=0.0263†
AGC (n=29)	3.99	2.27	NS

TIL = tumor infiltrating lymphocyte; EGC = early gastric carcinoma; AGC = advanced gastric carcinoma; NS = non-specific ($P>0.05$). *The % apoptotic TIL was calculated as the % CD45-ApopTag kit co-expressed cells per 1,000 total CD45-positive cells counted within FasL-positive/-negative tumor regions; † Wilcoxon Signed Ranks.

Table 6. TIL apoptosis in FasL-positive versus FasL-negative regions of gastric epithelial dysplasia and detailed gastric adenocarcinoma

	FasL-positive (% apoptotic TIL*)	FasL-negative (% apoptotic TIL)	Significance
Gastric epithelial dysplasia (n=9)	5.54	2.93	P=0.0420†
EGC (mucosa type) (n=10)	16.29	3.20	P=0.0298†
EGC (submucosa type) (n=8)	6.24	5.38	NS
AGC (intestinal type) (n=14)	2.50	2.30	NS
AGC (diffuse type) (n=15)	5.77	2.25	NS

TIL = tumor infiltrating lymphocyte; EGC = early gastric carcinoma; AGC = advanced gastric carcinoma; NS = non-specific ($P>0.05$). *The % apoptotic TIL was calculated as the % CD45-ApopTag kit co-expressed cells per 1,000 total CD45-positive cells counted within FasL-positive/-negative tumor regions; † Wilcoxon Signed Ranks.

Table 7. Histologic analysis of TIL apoptosis in FasL-positive versus FasL-negative regions of gastric epithelial dysplasia and gastric adenocarcinoma of intestinal type

	FasL-positive (% apoptotic TIL*)	FasL-negative (% apoptotic TIL)	Significance
Well differentiated (n=10)	8.85	3.88	NS
Moderate differentiated (n=9)	4.53	3.31	NS
Poorly differentiated (n=22)	6.74	2.87	p=0.0017†

TIL = tumor infiltrating lymphocyte; NS = non-specific ($P>0.05$). *The % apoptotic TIL was calculated as the % CD45-ApopTag kit co-expressed cells per 1,000 total CD45-positive cells counted within FasL-positive/-negative tumor regions; † Wilcoxon Signed Ranks.

정도를 조직학적 분화도 및 조직 침습정도에 따라 관찰해 본 결과 역시 FasL의 발현이 높은 종양주변에서 종양 침윤 림프구의 고사발현이 높게 관찰되었다. 조직의 분화도가 저분화암인 경우에 FasL 음성 부위보다 FasL 양성 부위에서 고사성 종양침윤림프구의 발현이 유의하게 증가하였다(Table 7), 그리고 점막 침범군에서만 FasL 음성 부위보다 FasL 양성 부위에서 고사성 종양침윤림프구의 발현이 유의하게 증가하였다(Table 8).

Table 8. Analysis of TIL apoptosis in FasL-positive versus FasL-negative regions of gastric adenocarcinoma according to depth of invasion

	FasL-positive (% apoptotic TIL*)	FasL-negative (% apoptotic TIL)	Significance
T1 (n=18)	10.93	4.11	P=0.0263†
T2 (n=6)	2.92	2.18	NS
T3 (n=18)	4.90	2.34	NS
T4 (n=5)	2.35	2.15	NS

T_1 = mucosa and submucosa; T_2 = proper muscle and subserosa; T_3 = serosa; T_4 = beyond serosa; NS = non-specific ($P>0.05$). *The % apoptotic TIL was calculated as the % CD45-ApopTag kit co-expressed cells per 1,000 total CD45-positive cells counted within FasL-positive/-negative tumor regions; † Wilcoxon Signed Ranks.

고 찰

본 연구는 국내에서 많은 부분을 차지하고 있는 위암에서 종양 및 종양 침윤 림프구의 FasL 발현 정도 및 고사 정도를 분석하고, 종양 침윤 림프구의 고사와 FasL 발현 간의 상관 관계를 파악하여, 종양 침윤 림프구의 수적 변화가 종양의 진행상태에 어떤 영향을 미치는가를 조직학적 아형 및 암의 침습도 등에 따라 분석 하고자 하며, 특히 위암 전구성병변에서 암으로의 이행에도 영향을 미치는가를 분석하고자 시행되었다.

Fas/FasL의 상호 작용은 악성 림프종 및 자가 면역성 질환 뿐 만 아니라 식도암 및 대장암과 같은 상피기원의 악성 종양에서 종양세포가 숙주의 끊임없는 면역감시를 피하는 과정에 관여한다.(5,15) 기존의 T 세포가 FasL을 발현하여 Fas를 갖는 암세포의 고사를 유도한다는 사실에 추가로 이와는 반대로 암세포가 FasL을 발현하여 암세포 주위의 Fas를 발현하는 T 림프구의 고사를 적극적으로 유도한다는 것이다.

최근 위암을 대상으로 한 Bennett등(16)의 연구에서 위암의 진행 과정 중에 종양 세포가 만들어 내는 FasL이 침윤성 암세포 주변의 종양 침윤 림프구의 고사를 유도하여 숙주의 면역감시를 역으로 피해가고 있음을 제시하였다. 그리고 이와 같은 역공격 현상은 종양세포의 FasL 발현능에 의하여 좌우되며, 이의 양적 변화에 따라 종양 주변 침윤 림프구의 고사가 초래되어 결과적으로 수적 변화가 초래됨을 유추하였다. 또한 이들은 in vitro 연구에서 대장의 선암세포에서도 FasL 발현을 증명하였는데 SW620 세포에 유도된 Fas 관련 고사를 보고하기도 하였다.

본 연구에서는 Bennet 등과는 달리 위암의 전구병변인 위상피이형성을 연구대상에 포함시켜 조사하였다. FasL의 발현은 암세포의 조직학적 분화도에 따른 유의성은 관찰되지 않았으며, 병기와 관련된 조직의 침습도에 따른 분석에서는 암의 조직 침습도가 심한 경우에 FasL 양성 부위보다 FasL 음성 부위에서 종양침윤림프구의 발현이 높았으며, 위상피이형성군과 조기위암군에서는 유의한 차이가 없었으나 진행성 위암군에서 FasL 양성 부위보다 FasL 음성 부위에서 종양침윤림프구의 발현이 유의하게 증가하였다. 하지만 FasL의 발현은 위암의 전구병변인 위상피이형성에서부터 조기 위암, 그리고 진행성 위암에서 광범위한 발현을 보였다. 따라서 암의 전구병변뿐 아니라 암의 초기부터 면역감시를 회피하기 위한 방법으로 Fas 역공격의 방법을 이용하고 있는 것으로 생각되었다.

한편, 많은 종양 세포들이 표면에 Fas와 그의 ligand (FasL)를 동시에 발현함에도 불구하고 그들 자신의 종양세포는 죽이지 않는 이유에 대해서는 의문이다.(5) O'Connell등(11)이 제안한 모델에 의하면 대장암 세포주와 활성화된 Jurkat T 세포를 이용한 실험을 통하여 대장암세포주가 FasL과 수용체 Fas를 동시에 발현하지만, Fas 매개성 고사에 내성이 있음을 관찰하고, 이의 원인을 세포표면 Fas 수용체의 발현이 줄어들든지, soluble Fas 수용체의 발현 등으로 Fas는 있으되 Fas 매개성 T 세포의 세포 독작용에 내성을 가지기 때문이며, 반대로 대장암 세포는 기능성 FasL을 발현하여 즉각적으로 종양 주변에 침윤된 Fas 민감 활성화 T 세포의 고사를 유도한다고 제시하였다.

본 연구에서 고사의 부위별, 정량적 관찰은 TUNEL 방법을 통하여 시도했는데, 이는 특정세포 핵 내의 분절된 DNA를 관찰하는 것으로 apoptotic body 뿐 아니라, 형태학적으로는 정상적으로 보이지만 고사가 진행되어 분절된 DNA를 가진 핵에서도 염색이 된다.(17) 종양 주변에 침윤된 종양 침윤 림프구의 수적 변화와 종양이나 림프구의 FasL 발현 정도 및 괴사성 종양 침윤 림프구의 변화를 관찰한 결과 FasL의 발현과는 상반되는 유의한 결과가 나타났는데, 종양의 FasL이 강하게 발현되는 부위는 종양 침윤 림프구의 감소가 두드러지고, 남아있는 림프구에서도 TUNEL 양성 고사가 증가되어 있는 반면에, FasL의 발현이 없는 부위는 종양 침윤 림프구의 증가 현상이 두드러지고, TUNEL 양성 고사가 현저하게 감소되어 나타났다. 이런 현상은 암의 병기나 암의 조직학적 변화도와 관련된 분석에서 광범위하게 관찰되었다. 또 조기 위암군을 점막 침범군과 점막하 침범군으로, 진행성 위암군을 미만형과 장형군으로 나누어 분석해 본 결과 점막 침범군에서만 의미 있는 발현이 관찰되었다(Table 6). 고사세포의 발현정도를 조직학적 분화도 및 조직 침습정도에 따라 관찰해 본 결과 역시 FasL의 발현이 높은 종양주변에서 종양 침윤 림프구의 고사발현이 높게 관찰되었다. 조직의 분화도가 저분화암인 경우에 FasL 음성 부위보다 FasL 양성 부

위에서 고사성 종양침윤림프구의 발현이 유의하게 증가하였다(Table 7). 그리고 점막 침범군에서만 FasL 음성 부위보다 FasL 양성 부위에서 고사성 종양침윤림프구의 발현이 유의하게 증가하였다(Table 8).

또한, 본 연구에서는 FasL의 발현정도가 진행성 위암군에 있어서 유의하게 관찰되었는데, 장형 세포군과 미만형 세포군 양자에서 모두 유의한 발현이 관찰되어 Vollmers 등(18)이 기존에 밝혔던 p53이 관련된 장형세포군의 고사 유도와 Fas가 관여하는 미만형 세포군의 고사정도의 차이가 있다는 내용과는 다른 결과를 보여주고 있어 추가 연구가 필요하리라 사료된다. 하지만 본 연구의 결과는 위암의 전구병변과 조기위암 및 암의 조직침습도가 미약한 비교적 초기의 병변에서 고사성 림프구의 침윤이 일관성 있게 관찰됨으로써 종양세포에 의한 FasL의 면역회피 기전은 비교적 암 발생 초기 단계 또는 암전구 단계에서부터 활발히 일어난다는 사실을 보여준다고 하겠다. 림프구 침윤 고사세포가 모두 Fas/FasL 상호 작용에 의하여 일어났다고 볼 수는 없으며, 이들과 유사한 단클론 항체(IgG, IgM) 등을 통한 고사도 일어날 수 있음을 상기해야 되는데,(19) 본 연구의 경우 종양 침윤 림프구와 종양세포의 고사 정도간에 역 상관 관계가 형성되는 경향이 있어 종양의 고사에는 종양 침윤 림프구가, 종양 침윤 림프구의 고사에는 종양세포가 상호 영향을 미치고 있음을 짐작할 수 있었다. 종양세포의 면역회피 과정에서 보이는 FasL의 역할은 이 물질이 면역반응에 정상적으로 반응하는 여러 가지 감소조절 역할에 의해서도 뒷받침된다.(11) FasL은 눈,(20) 고환,(21) 태반(22)에서 면역학적인 우위를 조절하는데 관여하고, 말초 변연부위(23)에서의 면역학적인 내성에도 관여할 뿐 아니라, 면역반응 정도를 줄이기도 하며,(24, 25) 대부분의 경우 실험적인 동종이식(26, 27)에도 관여하는데 이런 일련의 기전들이 FasL 매개 림프구의 고사에 관여한다. 또한 FasL은 광범위한 면역억제 기능도 가지고 있어 활성화된 T 세포,(24) B 세포,(25) NK 세포(28)와 호중구,(7) 단핵구(27) 등이 모두 FasL 매개성 고사와 민감한 관련성이 있다고 밝혀져 있다. 또한 TNF와 상동체인 FasL은 MMP(matrix metalloproteinase)에 의해 변환되어 가용체인 sFasL로 되어 여러 가지 면역반응에 참여할 수 있는 것으로 밝혀져 있는데 MMP inhibitor를 이용한 sFasL의 효과적인 차단이 가능할 것으로 보인다.(29) 위암의 경우 FasL의 발현은 mRNA와 단백합성 두 과정 모두에서 보인다. 그러므로 위암에 있어서 종양의 성장은 FasL의 발현을 통한 면역학적 우위에 의해서 나타난다고 여겨지며, 종양에서 FasL 발현의 높은 발현율은 이 물질이 종양의 면역학적 우위에 절대적임을 의미하는 것이다. 결론적으로 Fas에 의한 역공격 현상은 위암의 기전에 있어서 면역학적인 우위에 의해 생기는 기전임을 입증하기에 유력한 현상 중의 하나로 생각되며 위암의 전구병변인 위상피이형성에서부터 FasL의 발현을 통한 면역감시를 회피하는 것으로 보인다.

결 론

본 연구는 위상피이형성군 9예와 조기 위암군 18예 및 진행성 위암군 29예를 대상으로 하였는데, 위암은 FasL의 발현 정도에 따라 숙주의 면역 감시를 회피하고 있었으며, 이러한 능력은 암 전구단계 및 암의 초기단계에서부터 강하게 획득되어 암의 진행에 영향을 주고 있음을 알 수 있었다.

REFERENCES

1. Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. Br J Cancer 1972;26:239-257.
2. 김원호. 세포사멸과 질병. Med Postgraduates 1996;24:275-288.
3. Korsmeyer SJ. Bcl-2 initiates a new category of oncogenes: regulators of cell death. Blood 1992;80:879-886.
4. O'Connell J, O'Sullivan GC, Collins JK, Shanahan F. The Fas counterattack: Fas-mediated T cell killing by colon cancer cells expressing Fas ligand. J Exp Med 1996;184:1075-1082.
5. Bennett MW, O'Connell J, O'Sullivan GC, Brady C, Roche D, Collins JK, Shanahan F. The Fas counterattack in vivo: apoptotic depletion of tumor-infiltrating lymphocytes associated with Fas ligand expression by human esophageal carcinoma. J Immunol 1998;160:5669-5675.
6. Suda T, Takahashi T, Golstein P, Nagata S. Molecular cloning and expression of the Fas ligand, a novel member of the tumor necrosis factor family. Cell 1993;75:1169-1178.
7. Liles WC, Kiener PA, Ledbetter JA, Aruffo A, Klebanoff SJ. Differential expression of Fas (CD95) and Fas ligand on normal human phagocytes: implications for the regulation of apoptosis in neutrophils. J Exp Med 1996;184:429-440.
8. Takahashi T, Tanaka M, Inazawa J, Abe T, Suda T, Nagata S. Human Fas ligand: gene structure, chromosomal location and species specificity. Int Immunol 1994;6:1567-1574.
9. Yonehara S, Ishii A, Yonehara M. A cell-killing monoclonal antibody (anti-Fas) to a cell surface antigen co-downregulated with the receptor of tumor necrosis factor. J Exp Med 1989; 169:1747-1756.
10. Alderson MR, Armitage RJ, Maraskovsky E, Tough TW, Roux E, Schooley K, Ramsdell F, Lynch DH. Fas transduces activation signals in normal human T lymphocytes. J Exp Med 1993;178:2231-2235.
11. O'Connell J, Bennett MW, O'Sullivan GC, Collins JK, Shanahan F. The Fas counterattack: a molecular mechanism of tumor immune privilege. Mol Med 1997;3:294-300.
12. Hahne M, Rimoldi D, Schroter M, Romero P, Schreier M,

French LE, Schneider P, Bornand T, Fontana A, Lienard D, Cerottini J, Tschopp J. Melanoma cell expression of Fas (Apo-1/CD95) ligand: implications for tumor immune escape. Science 1996;274:1363-1366.
13. Niehans GA, Brunner T, Frizelle SP, Liston JC, Salerno CT, Knapp DJ, Green DR, Kratzke RA. Human lung carcinomas express Fas ligand. Cancer Res 1997;57:1007-1012.
14. Lee JH, Park JH, Yang MH. The effect of cyclophosphamide on Fas-mediated apoptosis. J Korean Med Sci 1997;12:185-189.
15. Rieux-Laucat F, Le Deist F, Hivroz C, Roberts IA, Debatin KM, Fischer A, de Villartay JP. Mutations in Fas associated with human lymphoproliferative syndrome and autoimmunity. Science 1995;268:1347-1349.
16. Bennett MW, O'connell J, O'sullivan GC, Roche D, Brady C, Kelly J, Collins JK, Shanahan F. Expression of Fas ligand by human gastric adenocarcinomas: a potential mechanism of immune escape in stomach cancer. Gut 1999;44:156-162.
17. Sugamura K, Makino M, Shirai H, Kimura O, Maeta M, Itoh H, Kaibara N. Enhanced induction of apoptosis of human gastric carcinoma cells after preoperative treatment with 5-fluorouracil. Cancer 1997;79:12-17.
18. Vollmers HP, Dammrich J, Hensel F, Ribbert H, Meyer-Bahlburg A, Ufken-Gaul T, von Korff M, Muller-Hermelink HK. Differential expression of apoptosis receptors on diffuse and intestinal type stomach carcinoma. Cancer 1997;79:433-440.
19. Vollmers HP, Dammrich J, Ribbert H, Wozniak E, Muller-Hermelink HK. Apoptosis of stomach carcinoma cells induced by a human monoclonal antibody. Cancer 1995;76:550-558.
20. Griffith TS, Brunner T, Fletcher SM, Green DR, Ferguson TA. Fas ligand-induced apoptosis as a mechanism of immune privilege. Science 1995;270:1189-1192.
21. Bellgrau D, Gold D, Selawry H, Moore J, Franzusoff A, Duke RC. A role for CD95 ligand in preventing graft rejection. Nature 1995;377:630-632.
22. Hunt JS, Vassmer D, Ferguson TA, Miller L. Fas ligand is positioned in mouse uterus and placenta to prevent trafficking of activated leukocytes between the mother and the conceptus. J Immunol 1997;158:4122-4128.
23. Mountz JD, Zhou T, Bluethmann H, Wu J, Edwards CK 3rd. Apoptosis defects analyzed in TcR transgenic and fas transgenic lpr mice. Int Rev Immunol 1994;11:321-342.
24. Alderson MR, Tough TW, Davis-Smith T, Braddy S, Falk B, Schooley KA, Goodwin RG, Smith CA, Ramsdell F, Lynch DH. Fas ligand mediates activation-induced cell death in human T lymphocytes. J Exp Med 1995;181:71-77.
25. Daniel PT, Krammer PH. Activation induces sensitivity toward APO-1 (CD95)-mediated apoptosis in human B cells. J Immunol 1994;152:5624-5632.
26. Stuart PM, Griffith TS, Usui N, Pepose J, Yu X, Ferguson TA. CD95 ligand (FasL)-induced apoptosis is necessary for corneal allograft survival. J Clin Invest 1997;99:396-402.
27. Arai H, Chan SY, Bishop DK, Nabel GJ. Inhibition of the allo-antibody response by CD95 ligand. Nat Med 1997;3:843-848.
28. Eischen CM, Schilling JD, Lynch DH, Krammer PH, Leibson PJ. Fc receptor-induced expression of Fas ligand on activated NK cells facilitates cell-mediated cytotoxicity and subsequent autocrine NK cell apoptosis. J Immunol 1996;156:2693-2699.
29. Kayagaki N, Kawasaki A, Ebata T, Ohmoto H, Ikeda S, Inoue S, Yoshino K, Okumura K, Yagita H. Metalloproteinase-mediated release of human Fas ligand. J Exp Med 1995;182: 1777-1783.