

식도 편평세포암종에서 변형 p53 단백질과 MAGE-3 유전자 산물의 발현

조 성 래* · 양 일 증* · 이 충 석* · 전 도 환* · 장 희 경**

=Abstract=

Expression of Mutant p53 and MAGE-3 Gene Products in Esophageal Squamous Cell Carcinoma

Sung Rae Cho, M.D.*, Il Chong Yang, M.D.*, Chung Seok Lee, M.D.*,
Do Hwan Chun, M.D.*, Hee Kyung Chang, M.D.**

Background: Despite recent advances in multimodality therapy, the prognosis for invasive esophageal cancer is poor, with five years survival rate generally below 10%. Therefore, immunotherapy is considered as one of the new therapeutic modality in esophageal cancer. However, expression of tumor specific antigen in tumor tissue should be necessary for immunotherapy of tumor. This study is to clarify that mutant p53 protein and MAGE-3 gene product is expressed in esophageal cancer specifically and they can be played a role of prognostic factors in esophageal cancer. **Material and Method:** Expression of mutant p53 protein and MAGE-3 gene products in formalin fixed, paraffin embedded samples of 79 patients with primary squamous cell carcinoma of the esophagus, who underwent esophageal resection, were analyzed immunohistochemically with DO-7 monoclonal antibody and anti-MAGE-3 antibody. Twenty cases of esophageal normal mucosa and 20 cases of leiomyoma which is a benign tumor of esophagus, were used as control groups. Immunoreactivities of mutant p53 and MAGE-3 gene product in esophageal cancer tissues were analyzed and the relationships between immunoreactivity of mutant p53 protein, MAGE-3 gene product and AJCC stage of esophageal cancer were determined by the Chi-square test. **Result:** Positive immunoreactivity of mutant p53 and MAGE-3 gene product were each of 41/79(51.9%), 48/79(60.8%) in esophageal cancer tissue, but 0% in normal mucosa and leiomyoma of esophagus($p < 0.001$). Both immunoreactivity of mutant p53 and MAGE-3 gene products were not related to AJCC stage of esophageal cancer($p = 0.193$, $p = 0.452$). There was not correlation between expression of mutant p53 protein and MAGE-3 gene product in esophageal cancer($p = 0.697$). **Conclusion:** Mutant p53 and MAGE-3 gene product cannot be a prognostic factor in squamous cell carcinoma of esophagus, but mutant p53 and MAGE-3 gene product

*고신대학교 의학부 흉부외과학교실

Department of Thoracic and Cardiovascular Surgery, College of Medicine, Kosin University

**고신대학교 의학부 해부병리학교실

Department of Anatomical Pathology, College of Medicine, Kosin University

† 대한 흉부외과 학회 제31차 추계 학술대회에서 구연 발표된 내용임

논문접수일 : 2000년 6월 29일 심사통과일 : 2000년 11월 17일

책임저자 : 조성래(602-702) 부산광역시 서구 암남동 34번지, 고신대학교 의학부 흉부외과. (Tel)051-240-6466, (Fax)051-254-5446

E-mail: srcho@ns.kosinmed.or.kr

본 논문의 저작권 및 전자매체의 지적소유권은 대한흉부외과학회에 있다.

is expressed in squamous cell carcinoma of the esophagus specifically, so esophageal cancer can be target for cytotoxic T lymphocyte in anticancer immunotherapy.

(Korean Thorac Cardiovasc Surg 2001;34:64-71)

Key word: 1. Esophageal neoplasm
2. Neoplasm marker

서 론

식도암은 많은 진단적 기술의 발전에도 불구하고 인체의 다른 암과 비교할 때 발견이 매우 늦기 때문에 지난 30년간 식도암의 치료를 위해 외과적 절제술, 방사선요법, 항암화학요법 등이 적극적으로 시행되어 왔으나 5년 생존율이 10% 내외로 치료성적이 그다지 향상되지 않고 있는 실정이다¹⁾. 그러므로 식도암의 치료를 위해 면역요법과 유전자요법에 대한 관심이 점차 고조되고 있다. 암면역 연구의 목표중 하나는 정상세포와 암세포가 가지고 있는 항원성의 차이점을 찾아서 암세포만 선택적으로 제거하는 치료방법을 밝히는데 있다. 면역계는 비자기(non-self)를 제거하려는 특성을 가지고 있으므로 이론적으로 종양 특이 항원을 이용한 암면역 치료는 암세포의 제거에 가장 좋은 방법으로 사료된다. 성공적인 암면역치료를 위해서는 암세포에서만 발현되는 종양 특이 항원을 발견하는 것이 매우 중요하다 하겠다. p53 유전자는 인간 염색체의 17q13에 위치하며 10개의 coding axon으로 구성되어 있다²⁾. p53 단백질은 395개의 아미노산 핵 인산단백으로 세포주기의 G1에서 S기로의 이행을 조절하는 세포증식의 조절에 관여함으로써 종양억제 유전자로서 뿐만 아니라 세포사를 결정하는 역할을 하는 것으로도 밝혀졌다³⁾. 따라서 p53유전자나 단백질의 변형이 되면 세포사의 기능이 정지됨에 따라 종양 형성에 관여하게 된다. p53 단백질의 발현과 예후에 관한 연구가 유암, 대장암, 위암, 폐암 등에서 시행되어 인체 종양에서 약 50~60%의 높은 빈도로 발견되고 p53 단백질이 발현될 때 예후가 불량한 것으로 보고하고 있으나⁴⁾ 식도암에서의 연구는 많지 않으며 예후와의 상관관계에 대해서는 확실히 밝혀져 있지 않다⁵⁾. Van der Bruggen 등⁶⁾은 흑색종 세포주로부터 세포독성 림프구(cytotoxic T lymphocyte)에 의해 인식되는 암항원을 code하는 유전자를 찾아내는데 성공하였으며 이 유전자를 melanoma antigen gene(MAGE gene)이라고 명명하였다. MAGE 유전자는 적어도 12개 이상의 유전자로 구성되어 있으며 Chromosome Xq에 위치한다. MAGE 유전자는 흑색종 뿐만 아니라 여러 종류의 암에서 발현되는 것으로 밝혀져 있지만 정상조직에서는 정소와 태반 이외에는 발현이 없는 것으로 알려져 있다⁷⁾. 또한 MAGE 유전자

를 발현하는 정소조직에는 HLA class I 분자가 없기 때문에 MAGE 유전자의 정상조직에서의 발현범위는 매우 국한되어 있어 MAGE 유전자는 암 특이 항원으로 면역치료의 잠재적 목표물로서 주목받고 있다. MAGE 유전자중 항원 펩타이드와 HLA class I 분자와의 관계가 가장 잘 알려진 것은 MAGE-1과 MAGE-3 유전자이며 MAGE-3 유전자는 항원 펩타이드가 한국인에서 가장 많은 HLA A2(59%)와 HLA B44(20%)에 의해 세포독성 림프구에 제시되기 때문에 백인 뿐만 아니라 한국인의 암면역 치료에도 의의가 있다^{8,9)}. 그러나 현재까지 MAGE-3 유전자 발현에 대한 연구는 대부분 역전사 중합효소 연쇄반응(reverse transcription polymerase chain reaction, RT-PCR), Southern blot analysis 등의 방법에 의한 mRNA 수준에서의 관찰이며, 면역조직화학염색을 이용한 발현에 대한 연구는 매우 드물다. 또한 한국인 식도암에서의 연구는 전무하다. 따라서 본 연구에서는 식도암의 대부분을 차지하는 식도 편평세포암종을 이용하여 면역조직화학염색을 시행하여 변형 p53 단백질과 MAGE-3 유전자 산물의 발현 빈도 및 양상을 조사하여 식도암이 면역치료의 대상으로 적합한지를 분석하고 아울러 이러한 유전자 발현과 기존의 임상 예후인자와의 상관성을 조사하여 이들 유전자 단백질이 종양의 예후인자로서 역할을 할 수 있는지를 규명하고자 한다.

대상 및 방법

1. 연구재료

1995년 1월부터 1998년 12월까지 고신대학교 복음병원 흉부외과에서 수술 치험한 125례의 식도암중 병리조직 보관상태가 양호한 편평세포암을 79례를 TNM 병기에 따라 I병기 19례, IIa병기 19례, IIb병기 10례, III병기 21례, IV병기 10례를 무작위로 추출하고 대조군으로는 식도 양성종양인 평활근종 20례와 암세포가 발견되지 않는 정상 식도점막 20례를 이용하였다.

2. 연구방법

1) 변형 p53단백과 MAGE-3 유전자 산물의 면역조직화학적 염색

포르말린으로 고정된 파라핀 포매조직을 이용하여 avidin-biotin-peroxidase complex(ABC)법의 면역조직화학적 염색을 다음과 같은 과정으로 시행하였다. 각 증례당 병리조직학적 검색상 조직 보존상태가 양호하면서도 종양을 대변할 수 있는 가장 대표적인 파라핀 포매된 블록을 4-5mm 두께의 절편을 만들어 60℃ 이하의 온도에서 건조시킨 후 항원의 표출을 증가시키기 위하여 30분간 50~56℃의 항온기에서 가온하여 xylene으로 탈파라핀화하고 함수시킨 후 절편을 전자렌지에서 5분간 미리 끓인 구연산(citric acid) 완충액(pH 6.0)에 넣어 전자렌지 내에서 5분간씩 두 번 끓인 후 실온에서 약 20분간 식혔다.

표본을 immunoassay buffer(pH 7.6, Biomed corp)에 10분간 담근 후 0.3% 과산화수소로 5분간 반응시켜 내인성 과산화수소를 억제시킨 다음 immunoassay buffer로 10분간 수세하고 정상 면역 혈청을 가하여 20분간 반응시켰다. 일차항체들을 첨가하여 실온에서 30분간 처리한 후 biotin이 부착된 항 생 쥐 면역혈청인 2차항체로 12분간 반응시키고 완충액으로 세척한 후 avidin과 결합한 과산화수소 복합체를 가하여 15분간 반응시켰다. 일차 항체로 변형 p53 단백질은 영국 Novocastra사의 DO7 단클론 항체를, MAGE-3 유전자 산물은 스위스 바젤대학의 Spaganoli 교수가 제공한 항 MAGE-3 단클론 항체 57B를 사용하였는데 이 항체는 MAGE-3 유전자의 전체를 포함하는 primer(sense : 5'-CGGGCTCGAGATGCCTTGAG CAGAGGAGT-3', antisense : 5'-CGCGCTCGAGCTCTTCCC CCTCTCTCAAAACCC-3')로 부터 얻어졌다. 이차 항체로는 변형 p53 유전자는 biotinylated anti-rabbit immunoglobulin을 이용하였다. 발색제는 AEC(3-amino-9-ethylcarbazole)를 사용하였으며 Meyer's hematoxylin으로 대조 염색후 양성반응을 관찰하였다.

2) 면역조직화학 염색의 평가

염색된 조직을 현미경에서 고배율로 관찰하여 적갈색으로 염색되면 양성으로 판독하였다. 암세포내에서의 변형 p53 유전자 산물은 핵내에서 발현되었고(Fig. 3) MAGE-3 유전자 산물은 세포질에서 발현되었다(Fig. 4). 결과의 판정은 변형 p53과 MAGE-3 유전자 산물이 암세포에서 발현되는 범위에 따라 10%이하의 발현을 -, 11~25% 발현을 +, 26~50% 발현을 ++, 51~75% 발현을 +++, 76% 이상 발현을 ++++로 판정하고 + 이상 발현되는 것을 양성으로 평가하였다.

3) 통계처리

변형 p53 단백질과 MAGE-3 유전자 산물의 발현율은 PC-SAS를 이용한 chi-square 검사를 시행하여 p값이 0.05 이하를 통계학적 유의성이 있는 것으로 판정하였고 변형 p53 단백질

Table 1. Immunoreactivity of mutant p53 in SCC, leiomyoma and normal mucosa of esophagus

	- (%)	+ (%)	++ (%)	+++ (%)	++++ (%)	Immuno-positivity (%)
SCC* (n=79)	38 (48.1)	7 (8.9)	18 (22.8)	13 (16.5)	3 (3.8)	41 (51.9)
Leiomyoma (n=20)	20 (100)	0	0	0	0	0
Normal mucosa (n=20)	20 (100)	0	0	0	0	0

* SCC, squamous cell carcinoma.

p<0.001

Table 2. Immunoreactivity of MAGE-3 gene in SCC, leiomyoma and normal mucosa of esophagus

	- (%)	+ (%)	++ (%)	+++ (%)	++++ (%)	Immuno-positivity (%)
SCC* (n=79)	31 (39.2)	20 (25.3)	5 (6.3)	8 (10.1)	15 (19.0)	48 (60.8)
Leiomyoma (n=20)	20 (100)	0	0	0	0	0
Normal mucosa (n=20)	20 (100)	0	0	0	0	0

* SCC, squamous cell carcinoma.

p<0.001

과 MAGE-3 유전자 산물의 발현 관련성은 kappa치를 구하여 상관관계를 조사하였다.

결 과

1. 식도 편평세포암증, 평활근종, 정상 점막조직에서 변형 p53 단백질의 발현

식도 편평세포암 조직에서 변형 p53 단백질은 세포핵에서 발현되었으며 79례중 41례에서 발현되어 51.9%의 발현율을 보였으나 평활근종과 정상 점막조직에서는 각각 20례중 한례도 발현되지 않아 변형 p53 단백질은 식도 편평세포암증에서 대조군에 비해 의미있게 발현되었다(p<0.001)(Table 1).

2. 식도 편평세포 암증, 평활근종, 정상 점막조직에서 MAGE-3 유전자 산물의 발현

식도 편평세포암 조직에서 MAGE-3 유전자 산물은 세포질에서 발현되었으며 79례중 48례에서 발현되어 60.8%의 발현율을 보였으나 평활근종과 정상 점막조직에서는 각각 20례

Table 3. Expression rate of mutant p53 and MAGE-3 gene products in esophageal carcinoma

	p53		MAGE-3	
	-(%)	+(%)	-(%)	+(%)
AJCC * stage				
I(n=19)	6 (31.6)	13(68.4)	9(47.4)	10(52.6)
IIa(n=19)	8.(42.1)	11(57.9)	10(52.6)	9(47.4)
IIb(n=10)	4.(40.0)	6(60.0)	3(30.0)	7(70.0)
III(n=21)	14(66.7)	7(33.3)	6(28.6)	15(71.4)
IV(n=10)	6.(60.0)	4(40.0)	3(30.0)	7(70.0)
p-value	0.193		0.452	

* AJCC, American Joint Committee on Cancer.

Table 4. Correlation between expression of mutant p53 and MAGE-3 gene products in esophageal carcinoma

p53	MAGE-3	
	-(%)	+(%)
-(n=38)	14(17.7)	24(30.4)
+(n=41)	17(21.5)	24(30.4)

p=0.679

중 한례도 발현되지 않아 MAGE-3 유전자 산물은 편평세포 암조직에서 대조군에 비해 의미있게 발현되었다(p<0.001) (Table 2).

3. 식도암 병기에 따른 변형 p53 단백질과 MAGE-3 유전자 산물의 발현

총 79례의 식도암중 AJCC 병기에 따른 변형 p53 단백질은 I 병기가 19례중 13례(68.4%), IIa병기가 19례중 11례(57.9%), IIb병기가 10례중 6례(60%), III병기가 21례중 7례(33.3%), IV 병기가 10례중 4례(40%)에서 각각 발현되어 병기에 따른 변형 p53 단백질의 발현율은 차이가 없었고(p=0.193), MAGE-3 유전자 산물은 I병기가 19례중 10례(52.6%), IIa병기가 19례중 9례(47.6%), IIb병기가 10례중 7례(70%), III병기가 21례중 15례(71.4%), IV병기가 10례중 7례(70%)에서 발현되어, 병기가 높아 질수록 MAGE-3 유전자 산물의 발현율이 높게 나는 경향을 보였으나 통계학적 유의성은 없었다(p=0.452)(Table 3).

4. 식도암 조직내 변형 p53 단백질과 MAGE-3 유전자 산물 발현간의 상관관계

식도암 79례중 변형 p53 단백질과 MAGE-3 유전자 산물의 발현이 일치하는 경우는 38례(48.1%), 불일치 하는 경우는 41례(51.9%)로, 두 유전자 산물의 발현은 통계학적으로 상관성

Table 5. Estimated candidates for mutant p53 and MAGE-3 specific immunotherapy on the basis of author's data in esophageal carcinoma of Korean

Tumor antigen	Positivity in esophageal carcinoma	Antigen peptide	Incidence of HLA class I molecule in Korean	Estimated candidate
p53	51.9%	LLGRNSFEV	HLA-A2	59% 30.6%
MAGE-3	60.8%	FLWGPRLAV	HLA-A2	59% 35.9%
		IMPKAGILI	HLA-A24	38% 23.1%
		MEVDPIGNLY	HLA-B44	20% 12.2%



Fig. 1. The immunohistochemical staining for MAGE-3 shows negative reaction on the non-neoplastic esophageal squamous epithelium(x200,ABC)

이 없는 것으로 나타났다(p=0.679)(Table 4).

5. 한국인 식도 편평세포암 환자에서 변형 p53 단백질과 MAGE-3 유전자 산물을 이용한 암면역 치료의 대상

본 연구결과에 따라 변형 p53 단백을 이용한 암면역 치료의 대상은 HLA-A2에서 30.6% 로 나타났고, MAGE-3 유전자 산물을 이용한 암면역 치료의 대상은 HLA-A2 35.9%, HLA-A24 23.1%, HLA-B44 12.2%로, 적어도 35.9%로 나타났다 (Table 5).

고 찰

변형 p53 단백질의 발현과 암의 임상적 악성도 및 예후와의 관계에 대한 연구가 유방암, 대장암, 위암과 폐암에서는 많이 시행되어 발표되고 있으나 식도암에 대한 연구는 그다지 많지 않고, 예후와의 관계에 대해서도 논란이 되고 있다^{4,5,10}.

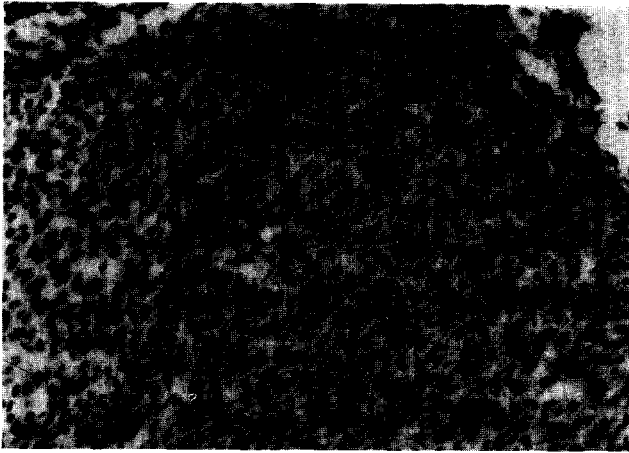


Fig. 2. The immunohistochemical staining for MAGE-3 shows negative reaction on the benign cellular leiomyoma.(x100,ABC)



Fig. 3. The immunohistochemical staining for p53 shows diffuse positive reaction on the nucleus of the tumor cells of esophageal squamous cell carcinoma.(x100,ABC)

본 연구에서 식도 편평세포암 조직과 식도 양성종양인 평활근종, 그리고 암세포가 발견되지 않는 정상 식도점막을 이용하여 덴마크 DAKO사의 DO7 단클론 항체를 이용하여 면역조직화학검사를 시행하여 변형 p53 단백질의 발현을 조사한 결과 편평세포암 조직에서 변형 p53 단백질은 암세포 핵에서 발현되었고(Fig. 3), 발현율은 79례중 41례 발현되어 51.9%로 나타나 타 보고들^{8,13,14)}인 34~67%의 범위에 속했다. 그러나 대조군인 평활근종과 정상점막에서는 한 레에서도 발현되지 않아 식도암 조직에만 특이적으로 발현되었다.

식도암의 미국 암학회 병기에 따른 변형 p53 단백질의 발현율을 비교한 결과 I기 68.4%, IIa기 57.9%, IIb기 60%, III기 33.3%, IV기 40%로 병기에 따른 발현율의 차이를 발견할 수 없었고($p=0.193$), 결과에는 언급하지 않았으나 T병기 및 N병기와 비교한 발현율 역시 차이가 없어 식도암의 악성도(aggressiveness)와 발현율간의 상관관계가 없는 것으로 나타나 최근에 식도 편평세포암 204례를 이용하여 연구하여 TNM병기와 변형 p53 단백질의 발현간에는 관련이 없다고 보고한 Sarbia 등¹⁰⁾과 일치하였다. 그러나 변형 p53 단백질이 암세포외의 다른 조직에서는 전혀 발현되지 않으므로 해서 변형 p53 단백질이 어느 단계인지는 알 수 없으나 암의 발생과 어떠한 관련을 유추할 수 있는데 식도암 전기 병변과 조기 식도암에서 변형 p53 단백질이 발현됨을 밝힌 Wang 등¹¹⁾과 Bennett 등¹²⁾의 연구와 증상이 없는 식도암 발병 고위험자의 정상 식도점막에서 변형 p53 단백질의 발현이 증가한다는 보고 등이 이를 뒷받침하고 있다.

식도 편평세포암에서 변형 p53 단백질의 예후인자로서 역할에 대해서는 많은 논란이 있다. Shimaya 등⁵⁾과 Wang 등¹¹⁾은 식도 편평세포암에서 변형 p53 단백질의 발현은 의미있는 예

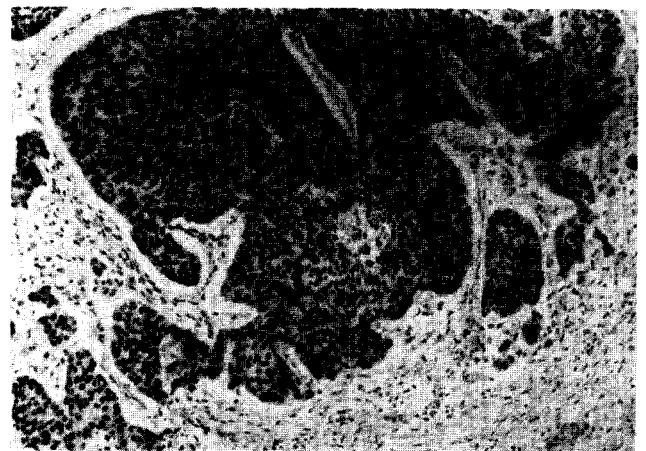


Fig. 4. The immunohistochemical staining for MAGE-3 shows positive reaction on the cytoplasm of the tumor cells of esophageal squamous cell carcinoma.(x100,ABC)

후인자로서의 역할을 하는 것으로 주장하였으나 다변수 분석을 시행하지 않았고 Sarbia 등¹⁰⁾과 Coggi 등¹³⁾은 단변수 분석과 다변수 분석을 시행하여 변형 p53 단백질의 발현이 예후와는 관련이 없다고 주장하였다. 이러한 결과들의 차이는 p53 단백질의 발현을 검사할때 사용되는 항체가 다른점과 대상환자가 각기 다르기 때문으로 추정된다. 본 연구에서는 연구대상 식도암 증례들에 대한 생존율의 분석을 시행치는 않았으나 일반적으로 병기가 높을수록 예후가 불량한 것을 감안할 때 Sarbia 등¹⁰⁾과 Coggi 등¹³⁾의 주장과 일치하였다.

MAGE 유전자의 발현에 대한 연구는 대부분이 RT-PCR(reverse transcription polymerase chain reaction)에 의한 mRNA 수준에서 이루어져 왔는데 이 방법은 검사방법이 복잡할 뿐만 아니라 조직의 어느 부분에서 발현되는지를 알기 어려운

단점이 있다. 그러나 저자들은 식도 편평세포 암조직과 평활근종, 그리고 암조직이 발견되지 않는 정상 식도점막을 향 MAGE-3 단클론 항체 57B를 이용하여 면역조직화학적 염색을 시행하였다. 면역조직화학 검사를 시행한 본 연구에서는 MAGE-3 유전자 산물이 식도 편평세포암종 79례중 48례, 60.8%의 발현율로, RT-PCR 방법을 이용하여 57%의 발현율을 보고한 Inoue 등¹⁴⁾과 47%의 발현율을 보고한 Quillien 등¹⁵⁾보다 높은 발현율을 보였다. 따라서 항 MAGE-3 단클론 항체를 이용한 면역조직화학 검사법은 보다 간편하며, 발견되는 부위까지도 알 수 있을 뿐만 아니라 높은 발현율을 보여 향후 MAGE-3 유전자의 발현을 연구하는데 널리 이용될 수 있을 것으로 사료된다.

MAGE-3 유전자 산물 역시 변형 p53 단백질과 마찬가지로 식도 양성종양인 평활근종과 정상 식도점막 각각 20례중 단 1례도 발현되지 않아 암세포에만 선택적으로 발현됨을 알 수 있었다. MAGE-3 유전자는 흑색종¹⁶⁾, 두경부암¹⁷⁾, 위암¹⁸⁾, 대장암¹⁹⁾, 유방암²⁰⁾, 신경아세포종²¹⁾ 등 여러 종류의 암조직에서 발현되는 것으로 알려져 있다. MAGE 유전자를 이용한 암치료가 가능하려면 암조직 이외의 다른 조직에서는 MAGE 유전자의 발현은 없어야 한다. 그러나 태반, 정소⁷⁾, 창상의 치유과정²²⁾에서 MAGE 유전자가 발현된다는 보고가 있으나, Takahashi 등²³⁾과 Brasseur 등¹⁶⁾은 태반과 창상의 치유과정에서 MAGE 유전자가 발현되지 않는다고 주장하였고, Van Pel²⁴⁾ 등은 정소에서 MAGE 유전자가 발현되나 정소조직에는 항원 펩타이드에 세포독성 T 림프구를 제시할 수 있는 HLA class I 분자가 없어 면역반응을 유발하지 못하기 때문에 암면역 치료시 암조직내에 있는 MAGE 유전자는 치료의 잠재적 목표물이 될 수 있을 것으로 사료된다.

MAGE 유전자의 생물학적 기능에 대해서 자세히 알려지지 않았으나 악성종양의 형질전환에 관여하는 것으로 추측되며, MAGE-3 유전자 산물이 세포질내에 발현되는 단백질이라고 Kohrer 등⁹⁾은 주장하였고, 본 연구에서도 Fig 4에서와 같이 세포질내에서 발현되었다. 세포질내 단백질은 MAGE-3 유전자 산물이 항원 처리 과정을 거쳐 HLA class I 분자와 결합하여 항원 펩타이드로서 세포독성 T 림프구에 제시될 수 있음을 의미한다.

MAGE 유전자의 발현과 암의 진행도 및 예후에 대해서 Ishida 등²¹⁾은 신경아세포종에 대한 연구에서 낮은 병기에서 MAGE 유전자의 발현율이 높았고 MAGE 유전자가 발현되는 암은 면역계에 의해 쉽게 인식되기 때문에 전이도 적고 예후도 좋았다고 하였다. 그러나 Russo 등²⁰⁾은 유방암에 대한 연구에서 MAGE 유전자의 발현과 전이와, 또 Inoue 등¹⁸⁾은 위암에서 MAGE 유전자 발현과 암의 진행도와는 관련이 없는 것으로 보고하였고, Mori 등¹⁹⁾은 대장암에서 전이가 있는

경우 오히려 높은 발현율을 보였다고 보고하여 MAGE 유전자 발현 역시 변형 p53 단백질의 발현과 마찬가지로 암의 악성도나 예후와의 관련성에 대해서는 논란이 되고 있다. 본 연구에서도 식도암 병기에 따른 MAGE-3 유전자 산물의 발현율을 비교한 바 I병기에서 10/19(52.6%), IIa병기에서 9/19(47.4%), IIb병기에서 7/10(70%), III병기에서 15/21(71.4%), IV병기에서 7/10(70%)로 병기와 관련이 없는 것으로 나타났고 (p=0.452), 연구대상 식도암의 생존율을 분석하지 않았기 때문에 MAGE-3 유전자 산물의 발현과 예후와의 관련성에 대해서는 말할 수 없으나, 일반적으로 식도암의 생존율은 병기와 관련이 있음을 고려할 때 MAGE-3 유전자 산물의 발현이 식도암에서 예후인자로서의 역할을 할 수 없을 것으로 생각된다.

Kirkin 등²⁵⁾은 MAGE-3 유전자 산물의 아미노산 염기 서열 (EVPAAESDPQPSPQSGASSLP)중 일부가 종양억제 단백질로 알려진 p53 유전자 단백질의 염기 서열(EAPRMPEAAPPVA-PAPAAPT)과 62-82 sequence가 일치하기 때문에 p53 유전자 단백질 처럼 종양의 성장을 억제시킬 수 있을 것이라고 주장하였다. 그러나 본 연구에서는 변형 p53 단백질과 MAGE-3 유전자 산물의 발현이 식도암의 악성도와 일치하지 않았고, 또 변형 p53 단백질의 발현과 MAGE-3 유전자 산물의 발현간의 상관성을 조사하였는데 변형 p53 단백질과 MAGE-3 유전자 산물의 발현이 일치하는 경우가 79례중 38례(48.1%), 불일치하는 경우가 79례중 41례(51.9%)로 두 단백질의 발현간에는 상관성이 없는 것으로 나타났다(p=0.679).

변형 p53 항원과 MAGE 항원은 많은 아미노산으로 구성되어 있으며, 이 중 일부 항원 펩타이드는 HLA A2, HLA A24, HLA B44에 의해 제시되고 세포독성 T 림프구에 의해 인식된다. Marchand 등²⁶⁾은 MAGE-3 항원에 양성인 HLA A1을 가진 진행된 흑색종 환자를 대상으로 MAGE-3 항원 펩타이드를 이용한 암면역 치료의 가능성을 제시하였다. 그러나 Valmori 등²⁷⁾은 MAGE-3/HLA A2 항원 펩타이드가 흑색종에서는 발현량이 너무 적어서 이 항원에 특이한 세포독성 T 림프구에 의해 인식되기 힘들다고 하였으나 변형 p53과 MAGE-3 유전자 산물을 구성하는 아미노산 중에 HLA A2와 결합이 가능한 항원 펩타이드가 발견될 수 있고 HLA A2 이외의 다른 HLA class I 분자와 결합이 가능한 항원 펩타이드가 존재할 가능성이 있으며, 여러가지 방법으로 이들 유전자 발현의 인위적인 유도가 가능하기 때문에 변형 p53과 MAGE-3 유전자를 이용한 암면역 치료가 가능하리라 사료된다.

한국인에서 HLA A2의 빈도는 59%, HLA A24는 38%, HLA B44는 20%이므로⁸⁾ 본 연구의 결과를 토대로 한국인에서 변형 p53과 MAGE-3 유전자 산물을 이용한 식도암 면역

치료의 대상을 산출해 보면 변형 p53 단백을 이용할 때는 HLA A2(LLGRNSFEV) 경우 30.6%(변형 p53/HLA A2 : 51.9% X 59%)이며, MAGE-3를 이용할 때는 HLA A2(FLWGPRLAV) 35.9%, HLA A24(IMPKAGILI) 23.1%, 그리고 HLA B44 (MEVDPIGNLY) 12.2%가 해당된다 하겠다.

식도 편평세포암종에서 변형 p53 단백질과 MAGE-3 유전자 산물의 발현이 암의 진행도와 예후인자로서의 역할은 할 수 없으나 암세포에만 특이하게 높은 빈도로 발현됨을 관찰하여 이들 유전자 산물을 이용한 면역 치료의 목표물이 될 수 있음을 확인하여 본 연구 결과가 향후 이들 유전자를 이용한 식도암 면역치료 연구에 기본적인 토대가 될 수 있을 것으로 생각한다.

결 론

이상의 결과로 변형 p53 단백질과 MAGE-3 유전자 산물의 발현율이 식도암 병기와는 관련이 없게 나타남으로써 변형 p53 단백질과 MAGE-3 유전자 산물의 발현은 식도암에서 예후 인자로서의 역할은 할 수 없으나, 식도 편평세포 암조직에만 특이하게 높은 빈도로 발현됨으로써 식도암도 면역치료의 대상이 될 수 있음을 확인하였다.

참 고 문 헌

1. Muller JM, Erasmi H, Stelzner M, Zieren U, Pichlmaier H. *Surgical therapy of esophageal carcinoma*. Br J Surg 1990;77:845-57.
2. Miller C, Mohandas T, Wolf D, et al. *Human p53 localized to short arm of chromosome 17*. Nature 1986; 319:783-4.
3. Hoffman B, Liebermann DA. *Molecular controls of apoptosis: differentiation/growth arrest primary response genes, protooncogenes, and tumor suppressor genes, as positive and negative modulators*. Oncogene 1994;9:1807-12.
4. Kanamoto A, Kato H, Tachimori Y, et al. *No prognostic significance of p53 expression in esophageal squamous cell carcinoma*. J Surg Oncol 1999;72:94-8.
5. Shimaya K, Shiozaki N, Inoue M, et al. *Significance of expression as a prognostic factor in esophageal squamous cell carcinoma*. Virchows Archiv A Pathol Anat 1993; 42:271-6.
6. van der Bruggen p, Traversari C, Chomez P, et al. *A gene encoding an antigen recognized by cytolytic T lymphocytes on a human melanoma*. Science 1991;254:1643-7.
7. De Plaen E, Arden K, Traversari C, et al. *Structure, chromosome localization, and expression of 12 genes of the MAGE family*. Immunogenetics 1994;39:121-9.
8. Kim SJ, Nisperos B, Mickelson E, et al. *The HLA system*

- in the Korean Population. Hum Immunol 1986;259-72.
9. Kocher T, Schulz-Trater E, Gudat F, et al. *Identification and intracellular location of MAGE-3 gene product*. Cancer Res 1995;55:2236-9.
10. Sarbia M, Porchen R, Borchard F, et al. *p53 protein expression and prognosis in squamous cell carcinoma of the esophagus*. Cancer 1994;74:2218-23.
11. Wang DY, Xiang YY, Tanaka M, et al. *High prevalence of p53 protein expression in patients with esophageal cancer in Linxian, China and its relationship to progression and prognosis*. Cancer 1994;74:3089-96.
12. Bennett W, Hollstein M, Metcalf R, et al. *p53 mutation and protein accumulation during multistage human esophageal carcinogenesis*. Cancer Res 1992;52:6092-7.
13. Coggi G, Bosari S, Roncalli M, et al. *p53 protein accumulation and p53 gene mutation in esophageal carcinoma*. Cancer 1997;79:425-32.
14. Inoue H, Mori M, Li J, et al. *Human esophageal carcinomas frequently express the tumor-rejection antigens of MAGE genes*. Int J Cancer 1995;63:523-6.
15. Quillien V, Raoul JL, Heresbach D, Collet B, Toujas L, Brasseur F. *Expression of MAGE genes in esophageal squamous-cell carcinoma*. Anticancer Res 1997;17(1A): 387-91.
16. Brasseur F, Rimoldi D, Lienard D, et al. *Expression of MAGE genes in primary and metastatic cutaneous melanoma*. Int J Cancer 1995;63:375-80.
17. Eura M, Ogi K, Chikamatsu K, et al. *Expression of the MAGE gene family in human head and neck squamous-cell carcinomas*. Int J Cancer 1995;64:304-8.
18. Inoue H, Mori M, Honda M, et al. *The expression of tumor-rejection antigen "MAGE" genes in human gastric carcinoma*. Gastroenterol 1995;109:1522-5.
19. Mori M, Inoue H, Mimori K, et al. *Expression of MAGE genes in human colorectal carcinoma*. Ann Surg 1996; 224:183-8.
20. Russo V, Traversari C, Verrecchia A, et al. *Expression of the MAGE gene family in primary and metastatic human breast cancer: implications for tumor antigen-specific immunotherapy*. Int J Cancer 1995;64:216-21.
21. Ishida H, Matsumura T, Salgaller ML, et al. *MAGE-1 and MAGE-3 or -6 expression in neuroblastoma-related pediatric solid tumors*. Int J Cancer 1996;8:375-80.
22. Becker JC, Gillitzer R, Brocker EB. *A member of the melanoma antigen-encoding gene(MAGE) family is expressed in human skin during wound healing*. Int J Cancer 1994;58:346-8.
23. Takahashi K, Schichijo S, Noguchi M, et al. *Identification of MAGE-1 and MAGE-4 proteins in spermatogonia and primary spermatocytes of testis*. Cancer Res 1995;55:3478-82.
24. Van Pel A, van de Bruggen P, Coulie PG, et al. *Gene coding for tumor antigen recognized by cytolytic T lymphocytes*. Immunol Rev 1995;145:229-50.
25. Kirkin AF, Dzhandzhugazyan K, Zeuthen J. *Melanoma-*

associated antigens recognized by cytotoxic T lymphocyte. APMIS 1998;106:665-79.

26. Marchand M, Weynants P, Rankin E, et al. Tumor regression responses in melanoma patients treated with a peptide encoded by gene MAGE-3. Int J Cancer 1995;63: 883-5.

27. Valmori D, Lienard D, Waanders G, et al. Analysis of MAGE-3-specific cytolytic T lymphocytes in human leukocyte antigen-A2 melanoma patients. Cancer Res 1997; 57:735-41.

=국문초록=

배경: 최근 치료법의 진보에도 불구하고 진행성 식도암의 예후는 5년 생존율이 10% 이하로 매우 불량하기 때문에 식도암에 대한 새로운 치료방법의 하나로 암면역 치료가 대두되고 있다. 암면역 치료를 위해서 MAGE 등 종양 특이항원이 연구의 대상이 되고 있으나 국내에서는 아직 이에 대한 연구가 없다. **대상 및 방법:** 1995년 1월부터 1998년 12월까지 고신대학교 복음병원 흉부외과에서 수술 치험한 125례의 식도암중 병리조직 보관상태가 양호한 편평세포암 79례를 병기에 따라(I병기 19례, IIa병기 19례, IIb병기 10례, III병기 21례, IV병기 10례) 무작위로 추출하고 대조군으로 평활근종 20례와 정상 식도점막 20례를 대조군으로 하여 DO7 단클론 항체와 항 MAGE-3 단클론 항체 57B를 이용하여 면역조직화학검사를 시행하여 변형 p53 단백질과 MAGE-3 유전자 산물의 발현율을 조사하고 식도암 조직에서 질병의 진행도를 반영하는 병기에 따른 발현율 및 변형 p53 단백질과 MAGE-3 유전자 산물의 발현율간의 상관관계를 조사하였다. **결과:** 식도암조직에서 변형 p53 단백질과 MAGE-3 유전자 산물의 발현율은 각각 51.9%, 60.8%의 발현율을 보였으나 식도평활근종과 정상 식도점막에서는 한례도 발현되지 않아 변형 p53 단백질과 MAGE-3 유전자 산물은 대조군에 비해 식도암 조직에서 의미있게 발현되었다($p < 0.001$). 변형 p53 단백질과 MAGE-3 유전자 산물의 발현은 I병기에서 68.4%, 52.6%, IIa병기에서 57.9%, 47.6%, IIb병기에서 60%, 70%, III병기에서 33.3%, 71.4%, IV병기에서 40%, 70% 각각 발현되어 병기에 따른 발현율의 차이는 없었다($p = 0.193$, $p = 0.452$). 식도암 조직내에서 변형 p53 단백질과 MAGE-3 유전자 산물의 발현간에는 상관관계가 없는 것으로 나타났다($p = 0.679$). **결론:** 이상의 결과로 변형 p53 단백질과 MAGE-3 유전자 산물의 발현은 식도암에서 예후인자로서의 역할은 할수 없으나 식도 편평세포암조직에서만 특이하게 높은 빈도로 발현됨으로써 식도암도 면역치료의 대상이 될 수 있음을 확인하였다.

- 중심 단어:** 1. 식도암
2. 변형 p53 단백질
3. MAGE-3 유전자 산물