

## 위암의 Fas-associated Death Domain Protein 단백질의 발현

가톨릭대학교 의과대학 병리학교실

이석형 · 이종우 · 박원상 · 이정용 · 유남진

### Immunohistochemical Analysis of Fas-associated Death Domain Protein Expression in Stomach Cancers

Sug Hyung Lee, M.D., Jong Woo Lee, Won Sang Park, M.D., Jung Young Lee, M.D. and Nam Jin Yoo, M.D.

Department of Pathology, College of Medicine, The Catholic University of Korea, Seoul, Korea

**Purpose:** Evidence exists that dysregulation of apoptosis is involved in the pathogenesis of cancer development. Fas-associated death domain (FADD) protein, an adaptor protein of death receptors, is a critical regulatory component of the extrinsic cell-death pathway that exerts its pro-apoptotic effect upon binding with death receptors. Expression of the FADD protein has not been reported in stomach cancer. The aim of this study was to explore the expression status of the FADD protein in stomach cancers.

**Materials and Methods:** In the current study, we analyzed the expression of the FADD protein in 60 advanced stomach cancer by using immunohistochemistry and a tissue microarray approach.

**Results:** Immunopositivity (defined as  $\geq 30\%$ ) was observed for the FADD protein in 23 (38%) of the 60 cancers. Normal gastric mucosal cells showed expression of the FADD protein.

**Conclusion:** Taken together, these results indicate that decreased expression of the FADD protein is a frequent event in stomach cancers and suggest that to avoid apoptosis, stomach cancer cells *in vivo* may need loss of FADD expression, which might contribute to tumor development. (J Korean Gastric Cancer Assoc 2003;3:80-83)

**Key Words:** Stomach cancer, Immunohistochemistry, FADD, Apoptosis

**중심 단어:** 위암, 면역조직화학법, FADD, 고사

### 서 론

고사(apoptosis)는 세포사(cell death)의 주된 발생기전으로 조직의 항상성, 세포분화 및 발생에 중요한 역할을 한다.(1, 2) 고사조절의 이상은 사람에게서 퇴행성 질환, 종양, 에이즈 등 여러 질병을 유발시킨다.(1,2) 정상세포에 비하여 암세포는 일반적으로 생리적 자극에 대해 고사가 잘 유발되지 않는 특성이 있으며, 이런 특성은 종양발생, 종양의 성장 및 전이에도 중요한 역할을 한다.(3) 고사를 유발하는 여러 경로는 많지만, intrinsic pathway와 extrinsic pathway로 나누는 것이 가장 흔한 분류이다.(1) Extrinsic pathway는 Fas, tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) receptor 같은 tumor necrosis factor family에 의해서 유발된다. (2) Fas는 세포표면에 존재하며 Fas ligand (FasL)와 결합한 후 고사 신호 (apoptosis signal)를 세포질 내에 위치하는 Fas의 death domain에 전달한다. 다시 Fas의 death domain은 Fas-associated death domain protein (FADD)의 death domain과 homotypic interaction으로 결합하고 연이어서 FADD의 death effector domain이 caspase-8 및 caspase-10의 death effector domain에 고사신호를 전달하고, caspase cascade에 의해 고사가 진행된다. TRAIL receptor는 역시 세포표면에 존재하며 TRAIL과 결합한 후 고사 신호(apoptosis signal)를 세포질 내에 위치하는 TRAIL receptor의 death domain에 전달한다.(1,2) Fas 경로와는 달리 이 때는 DAP-3라는 단백질이 FADD와 TRAIL receptor를 연결하며,(4) 다시 이어서 FADD의 death effector domain이 caspase-8 및 caspase-10의 death effector domain에 고사신호를 전달한다.

고사기전에 관여하는 물질의 이상이 발암과정에 중요한 역할을 한다는 증거들이 제시되고 있으며, Fas 경로의 이상 역시 이 과정에 중요한 역할을 한다고 알려져 있다. Fas 경로에 관여하는 물질의 돌연변이 및 발현감소 등이 밝혀져

책임저자 : 유남진, 서울특별시 서초구 반포동 505번지  
가톨릭대학교 의과대학 병리학교실, 137-701  
Tel: 02-590-1191, Fax: 02-537-6586  
E-mail: goldfish@catholic.ac.kr

접수일 : 2003년 2월 4일, 게재승인일 : 2003년 3월 4일  
본 연구는 2003년도 과학재단 MRC 연구지원으로 이루어진 것임  
(R13-2002-005-01004-0).

있다.(5-16) 특히, FADD의 돌연변이가 암세포에서 규명된 것은 FADD를 통해서 암세포가 고사를 억제하고 있을 수 있다는 사실을 보여주는 것이라고 하겠다.(7) FADD는 고사 기전을 조절하는 중요한 단백질이므로 중앙조직에서 이 단백질의 발현을 조사하는 것은 중앙의 고사를 예측하는데 중요하다고 생각된다. FADD 단백질의 발현에 관해서는 간암에서의 연구가 유일하며,(17) 위암에서는 연구 결과가 없는 실정이다. 본 연구에서는 면역조직화학법을 이용하여 FADD단백질의 발현을 정상 위 조직 및 위암 조직에서 연구하고자 한다.

**방 법**

**1) Tissue microarray 제작**

1999년 이후 서울, 부천 및 수원에 위치하고 있는 병원에서 근치적 위 절제술을 받은 60명의 진행성 위암 환자를 대상으로 하였다. 위암 환자의 파라핀 포매 조직을 5µm 두께로 박절하여 hematoxylin & eosin 염색을 실시한 후 3명의 진단병리 의사가 독립적으로 Lauren 분류에 따라 분류하였다. 장형(intestinal type)이 34예였으며 미만형(diffuse type)이 26예였다. 10% 포르마린에 고정되고 파라핀에 포매된 조직을 서로 다른 중앙 부위에서 0.6 mm 지름의 실린더로 3회 천공한 후 떼어서 다른 recipient 파라핀 블록으로 옮겨 심었다. 이 때 각 시료간의 간격은 0.8 mm였고, Tissue Arrayer (Gene Micro-Array Technologies, Silver Spring, MD)를 이용하였다. 또한, 정상 위 조직에 대해서도 1회 천공하여 옮겨 심었으므로, 한 개의 recipient block에는 240개의 시료가 심어졌다. Tissue microarray block을 4µm의 두께로 자르고 hematoxylin & eosin 염색하여 tissue microarray가 적절하게 만들어졌는지 확인하였다.

**2) 면역조직화학법**

Tissue microarray로부터 박절된 조직절편을 이용하여 FADD 단백질에 대한 면역조직화학법 검사를 시행하였다. 사람의 FADD 단백질에 대한 염소의 항체(Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA)가 일차 항체로 사용되었다. 면역조직화학검사의 결과를 극대화시키기 위하여 전자레인지를 이용한 항원 복원(antigen retrieval)과 biotinylated tyramide를 이용한 신호증폭이 시행되었으며 자세한 방법은 이전의 논문에 자세히 기술되었다.(5) 일차항체를 4°C에서 15시간, 2차 항체는 37°C에서 40분, Straptavidin-peroxidase는 실온에서 30분, biotinylated tyramide는 실온에서 7분, 2차 Straptavidin-peroxidase는 실온에서 30분을 각각 처리한 후, diaminobenzidine으로 반응산물을 현상하고 hematoxylin으로 염색하였다. 결과는 30% 이상의 세포가 양성이면 양성으로 판정하였다. 양성을 발현 강도에 따라서 +, ++, +++의 세 단계로 나누었다. 결과는 3명의 진단병리 의사가 독

립적으로 판독하였다. 통계처리는 Fisher's exact test를 이용하여 장형과 미만형 위암에서의 FADD발현의 차이를 분석하였다.

**결 과**

조사한 60예의 위암에서 FADD 단백질의 발현은 23예(38%)에서 양성이었다(Table 1, Fig. 1). 26예의 미만형 위암에서는 9예(35%), 34예의 장형 위암에서는 14예(41%)가 FADD 발현이 양성이었다고, FADD 발현은 미만형 및 장형 위암에서 발현의 통계학적 차이는 없었다(Fisher's exact test, two tails P>0.05). 또한, 위암의 침습 정도에 따른 FADD 발현의 차이도 관찰할 수 없었다. FADD의 면역조직화학 염색은 양성의 경우에는 세포질 내에 나타났다(Fig. 1A). 양성을 보인 위암 23예 중 10예가 +, 12예가 ++, 1예가 +++를 나타냈다(Table 1). Table 1은 위암의 FADD 면역조직화학 검사 결과를 요약한 것이다.

정상 위 조직에서 표면점막세포(surface mucous cell), 주세포(chief cell), 벽세포(parietal cell)는 모두 + 혹은 ++의 양성을 나타냈다(Fig. 1B). 섬유모세포는 FADD 면역염색이 되지 않아서 내부 음성 대조(internal negative control) 세포로 사용되었다. 일차항체 대신 염소 혈청을 사용한 음성 대조군은 FADD 면역염색에 대해 음성을 보였다(Fig. 1C).

**고 찰**

본 연구의 목적은 두 가지였다. 첫째는 death receptor에 의한 고사 유발에 중요한 역할을 하는 FADD가 위암 조직에서 발현하는지 여부를 판명하는 것이었고, 둘째는 정상 위 세포와 위암 세포에서 FADD 단백질의 발현이 차이가 있는지를 밝히는 것이었다. 정상 위 점막세포가 대부분 FADD에 대해 양성을 나타낸 것과 대조적으로 위암 세포는 낮은 발현도(38%)를 나타냈고, 이는 침습 정도 및 조직학적 유형과 무관하게 나타났다. 이런 결과는 많은 부분의 위암

**Table 1.** Summary of FADD expression in stomach cancers

Histologic types	FADD* expression <sup>†</sup>			
	-	+	++	+++
Intestinal	20	6	7	1
Diffuse	17	4	5	0
Total (%)	37 (62)	10 (17)	12 (20)	1 (2)

\*FADD = fas-associated death domain. <sup>†</sup> Intensity of expression is described as - (negative), + (weak positive), ++ (moderate positive) and +++ (strong positive).

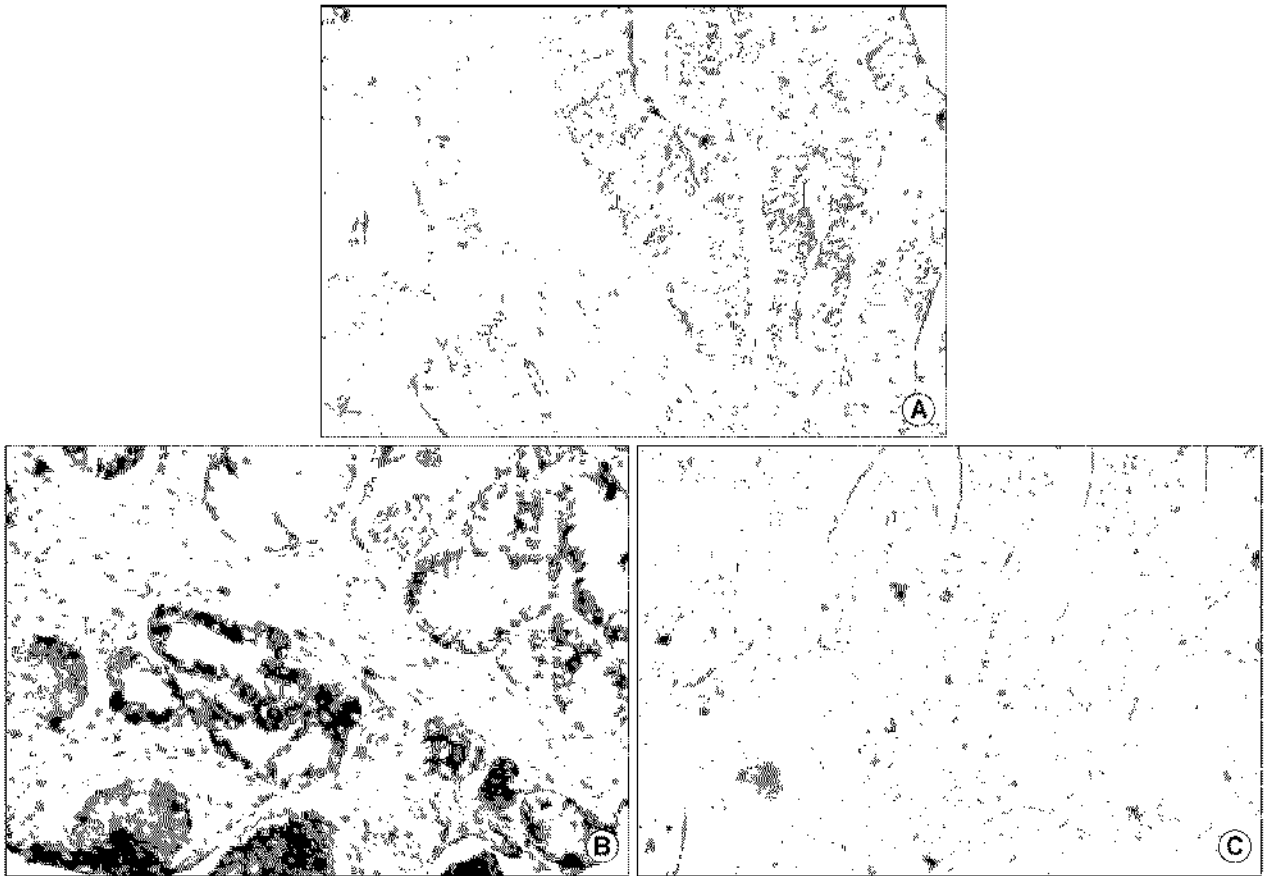


Fig. 1. Visualization of FADD protein in stomach cancers by immunohistochemistry. Antibodies were detected by a diaminobenzidine method that produces a brown color. Counterstaining of nuclei was done with hematoxylin (blue). A: Carcinoma cells shows immunoreactivity for FADD in the cytosol. Fibroblasts between the tumor nests are negative for the immunostaining. B: Normal mucosal cells show FADD expression in cytosol. C: Negative control of FADD immunostaining (H&E stain, ×200).

세포가 FADD를 소실함으로써, 위암세포의 고사를 방지하고 이를 통해 탈암과정에서 중요한 역할을 할 수 있음을 시사한다고 하겠다.

종양의 발생 및 진행과정에서 종양세포는 고사를 피할 수 있는 능력을 획득하게 되고 이를 통해 다양한 고사의 자극으로부터 자신을 보호하게 된다.(3) 종양세포에서 고사의 억제는 종양세포의 생존을 연장시키고 이를 통해서 더욱 유전자 손상을 받을 기회는 높은 것이다. Fas 고사경로를 저해하는 많은 기전이 알려져 있다. Fas, FADD, caspase-8, caspase-10 유전자의 돌연변이, Fas 단백질의 발현감소, Fas 단백질의 세포 내 위치 변화, soluble Fas의 생성, FLICE-like inhibitory protein (FLIP) 및 Fas associated phosphatase-1 (FAP-1), Bcl-2 같은 고사 저해물질의 생성 등이 그 예이다. (5-14) TRAIL 고사경로를 저해하는 기전은 상당 부분 Fas 고사경로 저해기전과 유사하며 추가적으로 Decoy receptor의 발현, TRAIL receptor의 돌연변이 등이 있다.(15,16) 위암에서의 Fas 및 TRAIL 고사경로 저해기전은 여러 가지가 밝

혀져 있는데, Fas, TRAIL receptor2, caspase-10의 돌연변이, (6,9,16) soluble Fas의 생성,(10) Fas 단백질의 세포 내 위치 변화,(10) FAP-1 단백질의 생성(13) 등이 그 예이다. 이처럼 여러 조절기전이 위암에 작용한다는 것은 추가 조절기전이 있을 가능성이 높다는 것을 암시 한다고도 할 수 있다. 본 연구는 Fas 고사경로의 adaptor인 FADD의 단백질 발현감소를 확인함으로써 FADD가 위에 열거한 위암의 Fas 및 TRAIL 고사저해 기전과 함께 위암세포의 생존연장에 간여할 가능성이 높다는 것을 밝힌 최초의 논문이다. 하지만, 어떤 고사 저해기전 등이 협동하여 이를 조절하는지, 위암 발생 및 진행의 다단계 모델에서 어떤 단계에 작용하는지는 현재의 연구로는 알 수 없으므로, 향후의 연구는 이런 여러 기전을 각각의 위암에서 조사하는 것이 필요할 것이다.

위암에 대한 많은 지식의 축적과 조기 발견 방법의 개발에도 불구하고, 많은 위암환자 등이 매년 사망한다. 최근에는 고사조절을 통한 많은 암 치료 연구가 시도되고 있다. (1) TRAIL을 이용한 종양 치료 모델은 최근 연구가 활발한

데, TRAIL은 정상세포의 TRAIL receptor는 자극하지 않고 종양세포의 TRAIL receptor 만을 자극해서 고사를 유도하기 때문이다.(15) 하지만, 모든 종양이 TRAIL에 반응하는 것은 아니기 때문에 그 저항기전에 대해서 연구가 필요하다. (15) FADD는 FasL 뿐 아니라 TRAIL에 의한 고사에도 관여하므로 FADD의 발현 감소는 종양의 TRAIL resistance를 일부 설명할 수 있을 것이다. 이러한 관점에서 본 연구는 고사 기전에 대한 기본적 자료뿐 아니라 향후의 위암 치료 연구를 위한 중요한 자료라고 생각된다.

결 론

우리나라에서 악성 종양의 수위를 차지하고 있는 위암에서 FADD 단백질의 발현을 알아보고 그 발현 정도가 정상 위장 점막세포와 차이가 있는 지를 알아보고자 FADD의 발현을 면역조직화학법을 이용하여 60예의 진행성 위암에서 조사하였다.

23%의 위암은 FADD를 발현하였으며, 정상 위 점막세포는 모두 FADD 발현을 보였다. 이 결과를 통하여 정상 위 점막세포가 발현하던 FADD가 발암과정에서 대부분 소실되는 것을 확인하였으며, 이는 위암세포가 FADD라는 고사 유발성 단백질의 발현을 감소시킴으로써 자신을 여러 고사 자극으로부터 보호하고 수명을 연장할 것이라는 것을 예측하게 하는 것이다. 그러므로, 본 결과는 FADD의 소실이 위암의 발생에서 고사의 저해에 대해 중요한 역할을 하리라는 것을 제시한다고 하겠다.

REFERENCES

1. Reed JC. Mechanisms of apoptosis. *Am J Pathol* 2000;39: 1415-1430.
2. Nagata S. Apoptosis by death factor. *Cell* 1997;88:355-365.
3. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell* 2000; 100:57-70.
4. Miyazaki T, Reed JC. A GTP-binding adapter protein couples TRAIL receptors to apoptosis-inducing proteins. *Nat Immunol* 2001;2:493-500.
5. Shin MS, Park WS, Kim SY, Kim HS, Kang SJ, Song KY, Park JY, Dong SM, Pi JH, Oh RR, Lee JY, Yoo NJ, Lee SH. Alterations of *Fas (Apo-1/CD95)* gene in cutaneous malignant melanoma. *Am J Pathol* 1999;154:1785-1791.
6. Park WS, Oh RR, Kim YS, Park JY, Lee SH, Shin MS, Kim SY, Kim PJ, Lee HK, Yoo NY, Lee JY. Somatic mutations in the death domain of the *Fas (Apo-1/CD95)* gene in gastric

- cancer. *J Pathol* 2001;193:162-168.
7. Shin MS, Kim HS, Lee SH, Lee JW, Song YH, Kim YS, Park WS, Kim SY, Lee SN, Park JY, Lee JH, Xiao W, Jo KH, Wang YP, Lee KY, Park YG, Kim SH, Lee JY, Yoo NJ. Alterations of *Fas*-pathway genes associated with nodal metastasis in non-small cell lung cancer. *Oncogene* 2002;21:4129-4136.
8. Mandruzzato S, Brasseur F, Andry G, Boon T, van der Bruggen P. A *CASP-8* mutation recognized by cytolytic T lymphocytes on a human head and neck carcinoma. *J Exp Med* 1997;186:785-793.
9. Park WS, Lee JH, Shin MS, Park JY, Kim HS, Lee JH, Kim YS, Lee SN, Xiao W, Park CH, Lee SH, Yoo NJ, Lee JY. Inactivating mutations of the *caspase-10* gene in gastric cancer. *Oncogene* 2002;21:2919-2925.
10. Leithuser F, Dhein J, Mechttersheimer G, Koretz K, Brnderlein S, Henne C, Schmidt A, Debatin K-M, Krammer PH, Miller P. Constitutive and induced expression of *APO-1*, a new member of the new growth factor/tumor necrosis receptor superfamily, in normal and neoplastic cells. *Lab Invest* 1993;69: 415-429.
11. Lee SH, Kim SY, Lee JY, Shin MS, Dong SM, Na EY, Park WS, Kim KM, Kim CS, Kim SH, Yoo NJ. Detection of soluble *Fas* mRNA using in situ reverse transcription-polymerase chain reaction. *Lab Invest* 1998;78:453-459.
12. Irmeler M, Thome M, Hahne M, Schneider P, Hofmann K, Steiner V, Bodmer JL, Schroter M, Burns K, Mattmann C, Rimoldi D, French LE, Tschopp J. Inhibition of death receptor signals by cellular *FLIP*. *Nature* 1997;388:190-195.
13. Lee SH, Shin MS, Park WS, Kim SY, Kim HS, Lee JH, Han SY, Lee HK, Park JY, Oh RR, Jang JJ, Lee JY, Yoo NJ. Immunohistochemical localization of *FAP-1*, an inhibitor of *Fas*-mediated apoptosis, in normal and neoplastic human tissues. *APMIS* 1999;107:1101-1108.
14. Martin SJ, Green DR. Apoptosis and cancer: the failure of controls on cell death and cell survival. *Crit Rev Oncol Hematol* 1991;18:137-153.
15. Griffith TS, Lynch DH. TRAIL: a molecule with multiple receptors and control mechanisms. *Curr Opin Immunol* 1998;10: 559-563.
16. Park WS, Lee JH, Shin MS, Park JY, Kim HS, Kim YS, Park CH, Lee SK, Lee SH, Lee SN, Kim H, Yoo NJ, Lee JY. Inactivating mutations of *KILLER/DR5* gene in gastric cancers. *Gastroenterology* 2001;121:1219-1225.
17. Sun B, Wang B, Zhao X. Expression of FADD in primary hepatocellular carcinoma and its relationship with hepatic apoptosis. *Zhonghua Gan Zang Bing Za Zhi* 2000;8:37-39.