

위암의 Phosphorylated Akt 단백질의 발현

가톨릭대학교 의과대학 병리학교실

이석형 · 이종우 · 박원상 · 이정용 · 유남진 · 김수영

Immunohistochemical Analysis of Phosphorylated Akt Protein Expression in Gastric Carcinomas

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

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

Purpose: Mounting evidence suggests that alterations of Akt/protein kinase B (PKB) play an important role in tumorigenesis. Phosphorylated Akt regulates many of the key effector molecules involved in apoptosis, angiogenesis, and cell-cycle progression during tumorigenesis. The expression of phosphorylated Akt has been described in some human malignancies, but not in primary human gastric cancer. The purpose of this study was to explore the expression status of phosphorylated Akt protein in gastric carcinomas.

Materials and Methods: In the current study, we analyzed the expression of phosphorylated Akt protein in 60 advanced gastric adenocarcinomas by using immunohistochemistry and a tissue microarray approach.

Results: Immunopositivity (defined as $\geq 30\%$) was observed for the phosphorylated Akt in 42 (70%) of the 60 cancers. Normal gastric mucosal cells showed no or weak expression of phosphorylated Akt protein.

Conclusion: Taken together, these results indicate that Akt is frequently activated in gastric adenocarcinoma cells and suggest that phosphorylated Akt may play a role in the development of human gastric adenocarcinomas. (J Korean Gastric Cancer Assoc 2003;3:88-92)

Key Words: Stomach cancer, Gastric carcinoma, Phosphorylated Akt, Apoptosis, Immunohistochemistry

중심 단어: 위암, 위선암, phosphorylated Akt, 고사, 면역조직화학법

서 론

Protein kinase B라고 알려진 Akt는 serine/threonine kinase 계열의 단백질이며, 지금까지 세 가지의 Akt 동위체(isoform)인 Akt-1, -2, -3가 확인되었다.(1-3) 여러 가지 다양한 자극에 의해서 Akt가 활성화가 되는데, 이런 활성화의 주된 기전은 kinase activation loop의 308번째 아미노산인 threonine과 carboxyl-terminal tail의 473번째 아미노산인 serine의 인산화이다. 최근의 연구의 의하면 Akt가 여러 가지 기전으로 종양발생에 역할을 하는 것으로 알려져 있다.(1-3) 활성화된 Akt는 성장촉진 인자의 제한 등의 다양한 자극에 의해 유발되는 고사를 억제하고 세포의 생존을 연장한다. Akt는 고사유발성 단백질인 BAD와 caspase-9을 불활성화 시키고, NF- κ B의 활성화 단백질인 I κ B를 자극시켜서 여러 항고사(anti-apoptosis)유전자의 전사(transcription)를 촉진한다.(4, 5) Akt의 활성화는 또한 cyclin D의 안정화와 p27^{Kip1} 단백질 농도를 감소 시켜서 세포주기를 조절하며, 혈관 내피세포의 nitric oxide의 생성을 유발하여 종양의 혈관생성을 촉진한다.(6,7) 이러한 Akt의 종양형성 촉진 기능은 활성화된 Akt vector를 동물에 투여하여 hemangiosarcoma를 유발시킴으로써 생체 내에서 확인되었다.(8)

Akt의 활성화가 종양형성에 필요하지만, 사람의 종양조직에서 활성화된 Akt의 발현에 관한 연구는 미미하다. Phosphorylated Akt는 난소암, 유방암, 전립선암 및 비소성 폐암에서 보고가 되었으며, 종양에 따라 Akt의 활성화는 종양의 발생 혹은 진행과 연관이 있는 것으로 밝혀졌다.(9-11)

Akt에 의한 종양발생기전은 인산화 뿐 아니라 Akt 유전자의 증폭으로도 설명되는데, 위암의 세포주의 일부에서는 Akt의 증폭이 보고된 바 있다.(12) 또한, Akt 단백질의 발현 증가가 암세포의 항고사기전과 연관이 있다는 보고 또한

책임저자 : 김수영, 서울특별시 서초구 반포동 505번지
가톨릭대학교 의과대학 병리학교실, 137-701
Tel: 02-590-1188, Fax: 02-537-6586
E-mail: suhulee@catholic.ac.kr

접수일 : 2003년 2월 22일, 게재승인일 : 2003년 4월 29일
본 연구는 2002년도 과학기술부 21세기 프론티어 연구사업개발
인간유전체기능 연구지원으로 이루어진 것임(M101KB010001-
02K0201-03710).

암이 Akt를 이용하여 자신의 생존을 증가시킬 가능성이 높음을 암시한다.(13) Akt는 고사기전을 조절하는 중요한 단백질이므로 중앙조직에서 phosphorylated Akt 단백질의 발현을 조사하는 것은 중앙의 고사를 예측하는데 중요하다고 생각된다. 하지만, 위암조직에서 phosphorylated Akt 단백질의 발현연구는 현재까지 보고가 없는 실정이다. 본 연구에서는 면역조직화학법을 이용하여 phosphorylated Akt 단백질의 발현을 정상 위 조직 및 위암 조직에서 연구하고자 한다.

방 법

1) Tissue microarray 제작

1999년 이후 서울, 부천 및 수원에 위치하고 있는 병원에 서 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. 장형이 34예였으며 미만형이 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 (Beecher Instrument, 미국)를 이용하였다. 또한, 정상 위 조직에 대해서도 1회 천공하여 옮겨 심었으므로, 한 개의 recipient block에는 240개의 시료가 심어졌다. Tissue microarray block을 4 µm의 두께로 자르고 hematoxylin-eosin 염색하여 tissue microarray가 적절하게 만들어졌는지 확인하였다.

2) 면역조직화학법

Tissue microarray로부터 박절된 조직절편을 이용하여 phosphorylated Akt 단백질에 대한 면역조직화학법 검사를 시행하였다. 사람의 phosphorylated Akt 단백질에 대한 토끼의 항체(Cell Signaling, 미국, 희석농도 1/50)가 일차 항체로 사용되었다. 이 항체의 특이성은 이전의 연구(9-11)에서 증

명되었다. 면역조직화학검사의 결과를 극대화시키기 위하여 전자레이지를 이용한 항원 복원(antigen retrieval)과 biotinylated tyramide를 이용한 신호증폭이 시행되었으며 자세한 방법은 이전의 논문에 자세히 기술되었다.(14) 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 2명의 진단병리 의사가 독립적으로 판독하였다. 통계처리는 Fisher's exact test를 이용하여 장형과 미만형 위암에서의 phosphorylated akt 발현의 차이를 분석하였다.

결 과

조사한 60예의 위암조직에서 phosphorylated Akt 단백질의 발현은 42예(70%)에서 양성이었다(Table 1, Fig. 1). 26예의 미만형 위암에서는 18예(69%), 34예의 장형 위암에서는 24예(71%)가 phosphorylated Akt 발현이 양성이었으며, phosphorylated Akt 발현은 미만형 및 장형 위암에서 발현의 통계학적 차이는 없었다(Fisher's exact test, two tails P>0.05). 또한, 위암의 침습 정도에 따른 phosphorylated Akt 발현의 차이도 관찰할 수 없었다. phosphorylated Akt의 면역조직화학 염색은 양성인 경우에는 세포질(Fig. 1A) 혹은 핵에(Fig. 1B) 나타났다. 양성을 보인 위암 34예 중 11예가 +, 21예가 ++, 10예가 +++를 나타냈다(Table 1). 핵에 발현된 phosphorylated Akt는 전체 양성 34예에서 10예(29%)였고, 미만형과 장형에서 각각 3예, 7예가 나타났다. Table 1은 위암의 phosphorylated Akt 면역조직화학 검사 결과를 요약한 것이다.

정상 위 조직에서 표면점막세포는 phosphorylated Akt이 음성 혹은 +의 양성으로 나타났다(Fig. 1C). 양성인 경우에도 염색은 핵이 아니라 세포질에 나타났다. 섬유모세포는 면역염색이 되지 않아서 내부 음성 대조(internal negative

Table 1. Summary of phosphorylated Akt expression in stomach cancers

Histologic types	Phosphorylated Akt expression* (location) [†]			
	-	+	++	+++
Intestinal	10	4 (C:2, N:2)	14 (C:12, N:3)	6 (C:4, N:2)
Diffuse	8	7 (C:6, N:1)	7 (C:5, N:1)	4 (C:3, N:1)
Total (%)	18 (30)	11 (C:8, N:3) (18)	21 (C:17, N:4) (35)	10 (C:7, N:3) (17)

*Intensity of expression is described as - (negative), + (weak positive), ++ (moderate positive) and +++ (strong positive).

[†] C = cytoplasm; N = nucleus.

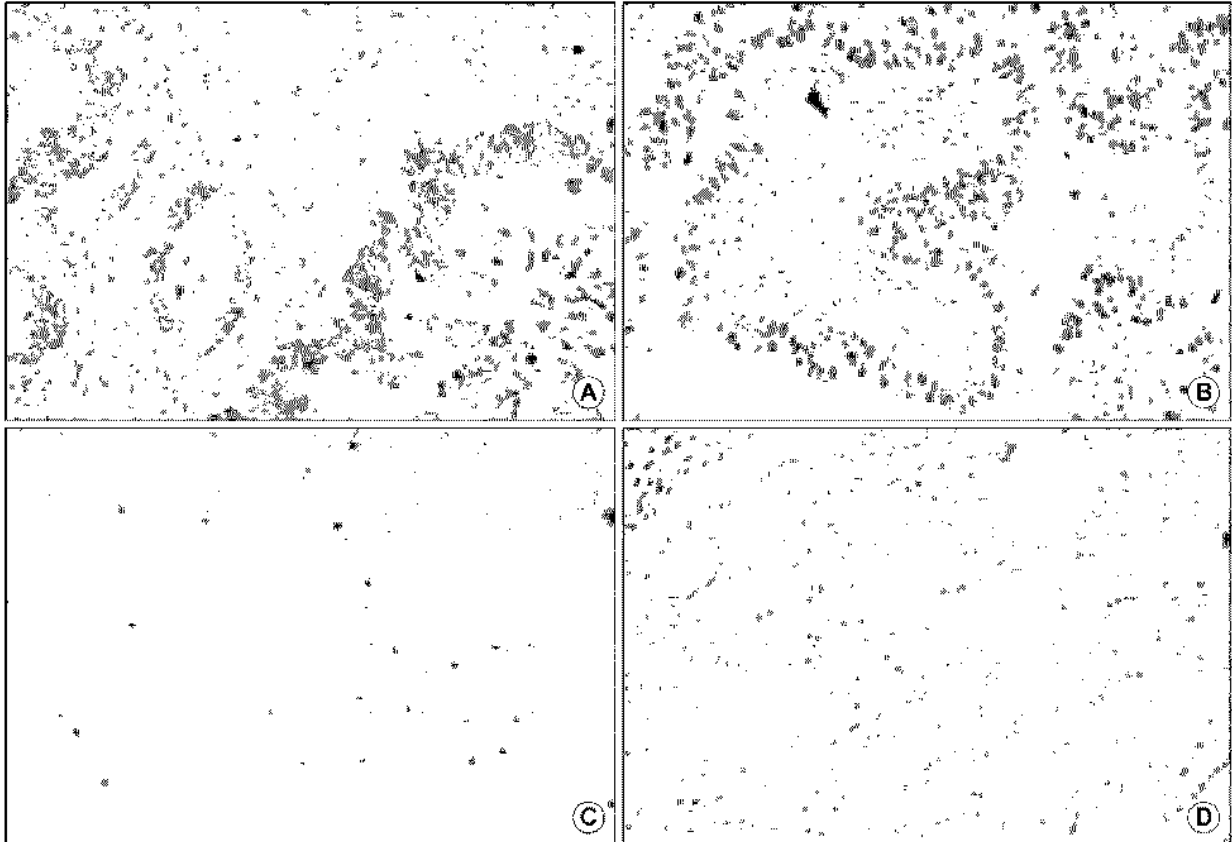


Fig. 1. Visualization of phosphorylated Akt protein in gastric carcinomas by immunohistochemistry. Antibodies were detected by a diaminobenzidine method that produces a brown color. Counterstaining of nuclei was done with hematoxylin (blue). A and B: Gastric carcinoma cells shows immunoreactivity for phosphorylated Akt in the cytosol (A) and nuclei (B). Fibroblasts between the tumor nests are negative for the immunostaining. C: Normal mucosal cells show negative to weak (+) phosphorylated Akt expression in cytosol. D: Negative control of phosphorylated Akt immunostaining (original magnification A, B, and D: $\times 200$, C: $\times 100$).

control) 세포로 사용되었다. 일차항체 대신 염소 혈청을 사용한 음성 대조군은 phosphorylated Akt 면역염색에 대해 음성을 보였다(Fig. 1D).

고 찰

본 연구의 목적은 두 가지 였다. 첫째는 종양발생에 중요한 역할을 한다고 알려진 phosphorylated Akt가 위암조직의 종양세포에서 발현하는 지를 확인하는 것이었고, 둘째는 정상 위 세포와 위암 세포에서 phosphorylated Akt 단백질의 발현이 차이가 있는지를 밝히는 것이었다. Phosphorylated Akt는 위암세포에서 높은 빈도(70%)로 발현하였으며, 대조적으로 정상 위 점막세포는 phosphorylated Akt를 발현하지 않거나 낮은 강도로 발현하였다. 또한, phosphorylated Akt의 발현은 위암의 침습정도 및 조직학적 아형과 무관하게 나타났다. 이런 결과는 인산화에 의한 Akt의 활성화가 위암의

발암과정에서 중요한 역할을 할 수 있음을 시사한다고 하겠다.

PSORT 분석(<http://psort.ims.u-tokyo.ac.jp>) 결과 Akt 단백질은 세포질 혹은 핵에 위치할 것으로 예측되었다.(11) 이런 예측처럼 phosphorylated Akt가 세포질과 핵에서 발현하는 것이 본 연구 및 다른 논문에서도 증명되었다.(9,11) 현재까지 phosphorylated Akt의 세포 내 위치의 다양성에 대한 정확한 의미는 알려진 바가 없지만, 몇몇 연구는 phosphorylated Akt의 세포내의 위치에 대해 의미를 부여하고 있다. 유방암 세포에서 phosphorylated Akt는 p21^{WAF1} 및 p21^{Kip1} 이 세포질 내에 위치하도록 유도하고 세포주기 진행을 촉진하여 암의 증식을 유도한다.(14) 또한, phosphorylated Akt는 p53의 억제자인 MDM2를 인산화시켜서 MDM2가 핵으로 이동하는 것을 촉진시켜서 p53의 기능을 소실시킨다.(15) 이처럼 phosphorylated Akt의 종양형성 촉진에 대한 역할이 세포질 내의 위치에 의해서 일부 설명이 된다. 하지만,

phosphorylated Akt의 핵에서의 종양형성에 관한 역할은 밝혀진 바가 없어 본 연구에서 핵에 발현된 phosphorylated Akt의 위암발생에 대한 기능은 추후의 연구가 필요한 실정이다.

종양의 발생 및 진행과정에서 종양세포는 고사를 피할 수 있는 능력을 획득하게 되고 이를 통해 다양한 고사의 자극으로부터 자신을 보호하게 된다.(16) 종양세포에서 고사의 억제는 종양세포의 생존을 연장시키고 이를 통해서 더욱 유전자 손상을 받을 기회는 높은 것이다. 고사는 또한 종양세포가 화학요법 및 방사선 치료를 통해서 사멸되는 중요 경로이다.(16) 그러므로 이론적으로 Akt의 인산화를 억제하는 방법의 개발은 종양치료 후에 종양세포가 생존하는 것을 막아서 암 환자의 생존을 증가시킬 수 있을 것이다. 실제로 Akt의 활성화 경로를 차단하는 많은 길항물질이 암의 고사를 유도한다는 많은 보고가 있다.(3) TRAIL을 이용한 종양 치료 모델은 최근 연구가 활발한데, TRAIL은 정상세포의 TRAIL receptor는 자극하지 않고 종양세포의 TRAIL receptor 만을 자극해서 고사를 유도하기 때문이다.(17) 하지만, 모든 종양이 TRAIL에 반응하는 것은 아니기 때문에 그 저항기전에 대해서 연구가 필요하다. 여러 암에서 Akt의 인산화가 TRAIL에 의한 암세포의 고사를 억제한다는 보고가 있어서, TRAIL 유도성 고사의 한 기전으로 이해할 수 있다.(18) 이러한 관점에서 생체내의 위암세포가 어느 정도 인산화된 Akt를 가지고 있는지를 밝힌 본 연구는 향후의 고사를 이용한 종양치료에 중요한 정보를 제공하리라 생각된다.

결 론

고사억제에 중요한 역할을 하는 Akt가 위암의 발생에 어떤 역할을 하는지를 알아보고자, 정상 위점막세포와 위암 조직에서 활성화 된 Akt인 phosphorylated Akt 단백질의 발현을 면역조직화학법을 이용하여 60예의 진행성 위암에서 조사하였다.

70%의 위암은 phosphorylated Akt를 발현하였으며, 정상 위 점막세포는 phosphorylated Akt를 발현하지 않거나 약하게 발현하는 것으로 위암세포가 phosphorylated Akt라는 고사억제성 단백질의 발현을 증가시킴으로써 자신을 여러 고사 자극으로부터 보호하고 수명을 연장할 것이라는 예측이 가능하였다. 본 결과 phosphorylated Akt의 발현에 의한 고사의 저해가 위암의 발생에서 중요한 역할을 하리라는 것을 제시한다.

REFERENCES

1. Testa JR, Bellacosa A. AKT plays a central role in tumorigenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98:10983-10985.
2. Testa JR, Bellacosa A. Membrane translocation and activation of the Akt kinase in growth factor-stimulated hematopoietic cells. *Leuk Res* 1997;21:1027-1031.
3. Wei L, Yang Y, Yu Q. Tyrosine kinase-dependent, phosphatidylinositol 3'-kinase, and mitogen-activated protein kinase-independent signaling pathways prevent lung adenocarcinoma cells from anoikis. *Cancer Res* 2001;61:2439-2444.
4. Khwaja A. Akt is more than just a Bad kinase. *Nature* 1999;401:33-34.
5. Ozes ON, Mayo LD, Gustin JA, Pfeffer SR, Pfeffer LM, Donner DB. NF-kappaB activation by tumour necrosis factor requires the Akt serine-threonine kinase. *Nature* 1999;401:82-85.
6. Muise-Helmericks RC, Grimes HL, Bellacosa A, Malstrom SE, Tschlis PN, Rosen N. Cyclin D expression is controlled post-transcriptionally via a phosphatidylinositol 3-kinase/Akt-dependent pathway. *J Biol Chem* 1998;273:29864-29872.
7. Dimmeler S, Fleming I, Fisslthaler B, Hermann C, Busse R, Zeiher AM. Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt-dependent phosphorylation. *Nature* 1999;399:601-605.
8. Mende I, Malstrom S, Tschlis PN, Vogt PK, Aoki M. Oncogenic transformation induced by membrane-targeted Akt2 and Akt3. *Oncogene* 2001;20:4419-4423.
9. Kurose K, Zhou XP, Araki T, Cannistra SA, Maher ER, Eng C. Frequent loss of PTEN expression is linked to elevated phosphorylated Akt levels, but not associated with p27 and cyclin D1 expression, in primary epithelial ovarian carcinomas. *Am J Pathol* 2001;158:2097-2106.
10. Sun M, Wang G, Paciga JE, Feldman RI, Yuan ZQ, Ma XL, Shelley SA, Jove R, Tschlis PN, Nicosia SV, Cheng JQ. AKT1/PKBalpha kinase is frequently elevated in human cancers and its constitutive activation is required for oncogenic transformation in NIH3T3 cells. *Am J Pathol* 2001;159:431-437.
11. Lee SH, Kim HS, Park WS, Kim SY, Lee KY, Kim SH, Lee JY, Yoo NJ. Non-small cell lung cancers frequently express phosphorylated Akt; an immunohistochemical study. *APMIS* 2002;110:587-592.
12. Staal SP. Molecular cloning of the akt oncogene and its human homologues AKT1 and AKT2: amplification of AKT1 in a primary human gastric adenocarcinoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987;84:5034-5037.
13. Page C, Lin HJ, Jin Y, Castle VP, Nunez G, Huang M, Lin J. Overexpression of Akt/AKT can modulate chemotherapy-induced apoptosis. *Anticancer Res* 2000;20:407-416.
14. 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.
15. Mayo LD, Donner DB. A phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway promotes translocation of Mdm2 from the cytoplasm to the nucleus. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98:11598-603.

16. Reed JC. Mechanisms of apoptosis. *Am J Pathol* 2000;39: 1415-1430.
 17. Griffith TS, Lynch DH. TRAIL: a molecule with multiple receptors and control mechanisms. *Curr Opin Immunol* 1998;10: 559-563.
 18. Nesterov A, Lu X, Johnson M, Miller GJ, Ivashchenko Y, Kraft AS. Elevated AKT activity protects the prostate cancer cell line LNCaP from TRAIL-induced apoptosis. *J Biol Chem* 2001;276:10767-10774.
-