

활액막 육종에서 새로운 종양 표지자로서 TLE1의 가치

성균관대학교 의과대학 삼성서울병원 정형외과학교실, 병리과학교실*

조은윤* · 김동욱 · 서성욱

목적: 활액막 육종에서 TLE1의 발현과 정상 조직에서의 발현을 비교하고 환자의 예후와의 관련성을 알아 보고자 한다.

대상 및 방법: 2001년 1월부터 2008년 9월까지 삼성서울병원에서 수술 및 치료를 시행한 36예의 활액막 육종 환자들의 조직과 정상 대조군 조직들에서 TLE1의 발현을 비교 분석하였다. TLE1의 발현 정도를 음성, 약 양성, 중등도 양성, 강 양성으로 분류하였고, 환자들의 전체 생존율을 분석하여 관련성을 알아보았다.

결과: 정상 간엽조직에서는 TLE1의 발현이 관찰되지 않았고, 분화가 빠른 정상 혈관의 내피세포와 상피세포에서 TLE1의 발현이 약하게 관찰되었다. 활액막 육종 36예 중 35예에서 TLE1의 발현을 확인할 수 있었다. 이 중 28예에서는 중등도 이상의 발현, 5예에서는 약한 발현, 2예는 매우 강한 강도의 발현을 보였으며, 활액막 육종에서 TLE1의 발현 정도와 예후와는 통계적 연관성이 없었다.

결론: TLE1은 향후 활액막 육종의 진단에 효과적으로 사용될 수 있을 것으로 생각되며, 정상 조직에서의 발현도가 낮으므로 종양의 표적 치료시의 좋은 target으로 사용될 수 있는 새로운 인자로 생각된다.

색인 단어: 활액막 육종, TLE1, 종양표지자, 예후

서 론

활액막 육종은 연부 악성 종양의 6~10%를 차지하는 매우 드문 종양이다. 석회화 또는 이형성 골을 동반하기도 하며, 진단되기 전 수 년에 걸쳐 서서히 자라기도 한다. 서서히 자라는 양상에도 불구하고, 예후는 좋지 않으며, 5년 생존률이 55%에서 76% 정도로 알려져 있다^{1,6,9)}. 많은 후향적 연구들은 이

종양이 임상적, 생물학적으로 다양하게 나타남을 보고 하고 있다. 이 종양은 기존의 항암제나 방사선 치료에 대한 저항성을 보여, 전이와 재발 등 병기가 진행된 경우 그 예후가 매우 불량하다.

Transducin-like Enhancer of Split 1 (TLE1)은 Notch signaling pathway에 관여하는 Drosophila groucho gene의 human homologues로서 전사인자(transcriptional factor)들

*통신저자: 서 성 욱

서울특별시 강남구 일원동 50

성균관대학교 삼성서울병원 정형외과학교실

Tel: (02) 3410-1229, Fax: (02) 3410-0061, E-mail: sungwook.seo@samsung.com

과 협력하여 여러 유전자들의 발현에 관여한다²⁾.

TLE1은 세포의 초기 분화단계와 성장에 관여하는 것으로 알려져 있지만, 아직 암세포에서의 역할은 알려진 바 없다. TLE1은 활액막 육종에서 과다 발현되는 것으로 알려져 있지만¹⁰⁾, 그 생물학적 역할에 대해 알려진 것은 없다.

이와 같이 이 유전자는 종양의 표지자로서의 그 생물학적 역할에 대해 연구된 적이 없기에 저자들은 TLE1이 종양의 표지자로서 갖추어야 할 요건을 충족하는 지 알아보기로 하였다. 즉, 1) 과연 얼마나 많은 활액막 육종 환자에서 발현되며, 2) 발현 정도에 차이가 있는지, 또한 3) 암세포가 아닌 정상 조직에서는 얼마나 발현이 되는지 연구를 시행하였다. 또한, 4) 그 발현 정도가 종양의 생물학적 특성에 미치는 영향을 알아보기 위해 단변수 생존분석(univariate survival analysis)을 통하여 환자의 예후와의 관련성을 알아보았다.

연구 대상 및 방법

1. 연구 대상

2001년 1월부터 2008년 9월까지 수술 및 치료를 시행한 36예의 활액막 육종 환자들을 대상으로 하였다. 남성이 17예, 여성이 16예였으며, 나이는 10세-81세(평균 38세)이었으며 종양이 몸통(폐 등)에 위치한 경우는 11예, 사지에 위치한 경우는 25예이었다. 면역염색 검사를 통하여 TLE1의 발현 정도를 선행 조사하였으며 정상 대조군으로는 정상 조직 혈관내피세포, 골격근, 섬유 아세포, 지방세포, 말초신경, 및 폐포 조직 등을 이용하였다.

2. 면역 염색법

포르말린에 고정하여 파라핀 포매된 조직을 두께 4 μ m의 slide에 탈파라핀하여 항원 retrieval을 위해 EDTA buffer 용액 (LEICA, Germany)에서 20분간 처리하였고 Bondmax 자동염색기계 (Leica Biosystems, Newcastle, UK)로 염색하였다. 항체는 rabbit polyclonal TLE1 (ab15587, Abcam, Cambridge, UK)를 이용하였다. 400배 현미경 검사상 핵 내에 갈색으로 염색되는 세포를

양성으로 판독하였다. 염색의 강도는 주위의 혈관 내피세포와 비슷한 정도는 약 양성(grade 1), 매우 강한 발현을 보이는 것은 강 양성(grade 3)로, grade 3과 1의 중간 정도의 발현을 중등도 양성(grade 2)로 하였다.

3. 통계적 분석법

전체 36명의 활액막 육종에서 TLE1의 발현 정도를 음성(grade 0), 약 양성(grade 1), 중등도 양성(grade 2), 강 양성(grade 3)으로 분류하고, 환자의 예후 지표로는 전체 생존률(overall survival)을 이용하였다. software SAS, version 9.13(SAS Institute Inc, Cary, NC)를 이용하여 95%의 신뢰구간에서 Cox regression univariate analysis를 시행하였다.

결 과

1. 환자군의 분포와 예후 관련인자

종양의 크기가 5 cm 미만인 경우는 16명이었고, 종양의 크기가 5 cm 이상인 경우는 20명이었다. 근막하에 깊이 위치한 종양은 22명이었고, 근막 위의 표면에 위치한 종양의 경우는 14명이었다. 초기 진단시에 이미 전이가 있었던 환자는 13명이었다. AJCC (American Joint Committee on Cancer) 병기는 IIa기가 14명, IIb기가 1명, III기가 8명, IV기가 13명이었다. 추시 기간 중 사망한 환자는 12명(33%)이었다. 전체적인 환자의 분포는 Table 1과 같다.

2. 정상 조직과 활액막 육종의 면역 염색 비교

정상 간엽조직(지방, 근육, 섬유질, 말초 신경)에서는 그 발현이 관찰되지 않았다(Fig. 1D).

분화가 빠른 정상 혈관의 내피세포와 상피세포에서 TLE1의 발현이 약하게 관찰되었다(Fig. 1E).

발현 정도는 활액막 육종에 비하여 매우 약하게 관찰 되었다.

전체 활액막 육종 36예 중 35예(97.2%)에서 TLE1의 발현을 확인할 수 있었다. 이 중 5예에서

는 주변의 혈관내피세포와 비슷한 정도의 약한 발현 (grade 1)을 보였고(Fig.1B), 2에는 매우 강한 강도의 발현 (grade3)을 보였으며(Fig.1C), 대부분의 28예에서는 중등도 이상의 발현(grade 2)을 보

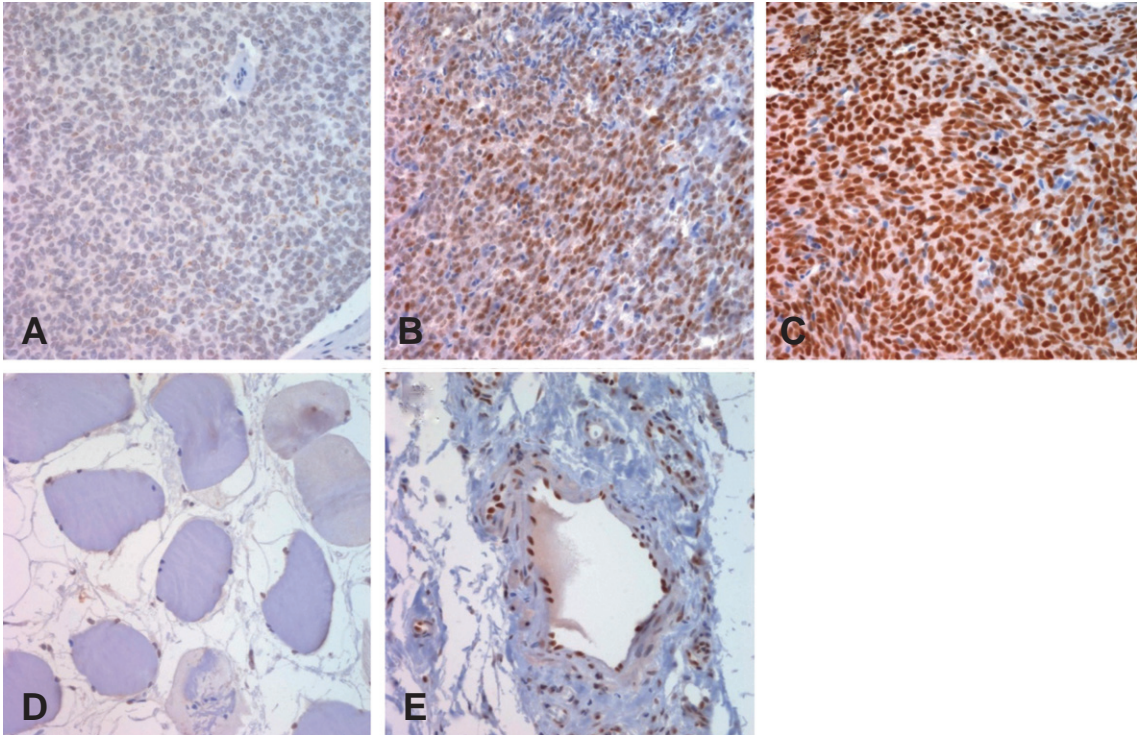


Fig. 1. Rabbit polyclonal TLE1 (ab15587, Abcam, Cambridge, UK) was used for TLE1-immunostain. A-C. TLE1 was stained in the nucleus of spindle shaped synovial sarcoma cell (A) negative stain, (B) intermediate, (C) strong positive, (D) Normal skeletal muscle was not stained by TLE1 Ab (negative stain), (E) Some proportions of endothelial cells showed positive stain in blood vessels (endothelial cells: intermediate positive) (DAB-Immunohistochemical staining, HE stain, $\times 400$).

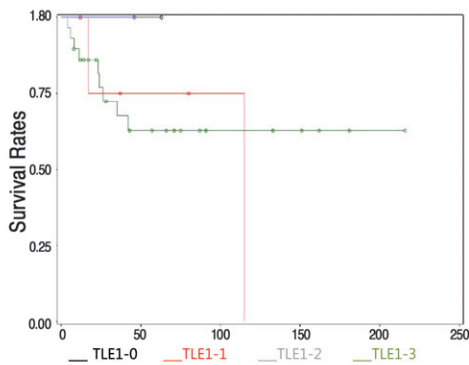
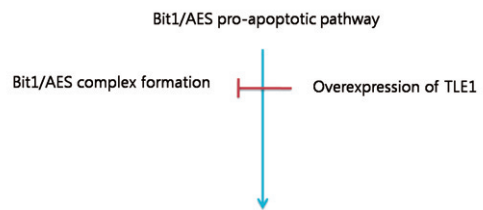


Fig. 2. Cox regression Univariate analysis was used to analyze the prognostic meaning of TLE1 expression. Survival of patients was not correlated to the grades of TLE1 expression. (p-value = 0.5583).

ROLE OF Grg/TLE IN APOPTOSIS



Clinical evidence : elevated TLE1 expression is unfavorable prognostic sign in lymphoma

Fig. 3. The presenting pathway indicates that overexpression of TLE1 gene can inhibit Bit/AES complex formation, thus inhibiting atypical cell apoptosis.

였다(Table 1).

석하였으며, 그 결과 통계적으로 의미 있는 차이가 발견되지는 않았다(p-value = 0.5583) (Fig. 2).

3. TLE1과 환자의 예후와의 관계

고 찰

활액막 육종에서 TLE1의 발현 정도와 예후의 관련성을 Cox regression Univariate analysis로 분

본 연구에서 저자들은 활액막 육종에서의 TLE1 발

Table 1.

Case	Age	Sex	IHC grade	Overall survival (month)	Size (cm)	Location	Depth	Initial metastasis	AJCC stage	Death
1	33	F	2	6	8	thigh	b	-	III	0
2	64	F	2	91	5	foot	a	-	IIb	
3	10	M	2	87	2.2	hand	a	-	IIa	
4	32	M	2	87	4.5	lower leg	b	lung	IV	
5	40	F	1	80	16	thigh	b	-	III	
6	25	M	2	75	3	ankle	a	-	IIa	
7	36	M	2	71	3.5	knee	b	-	IIa	
8	49	F	2	66	1	knee	b	-	IIa	
9	62	F	2	57	7.3	foot	a	lung	IV	0
10	54	M	2	24	18	thigh	b	-	III	0
11	24	M	0	63	2.5	shoulder	b	axillary lymph node	IV	
12	33	F	2	216	8	foot	b	-	III	
13	37	M	2	42	4.9	axial	b	chest wall	IV	0
14	13	F	3	46	4.5	ankle	a	-	IIa	
15	21	F	2	35	8	thigh	b	lung	IV	0
16	69	F	2	43	1.3	shoulder	a	-	IIa	
17	38	M	2	23	10	thigh	b	lung, liver, pancreas	IV	0
18	81	F	1	17	18	kidney	b	-	III	0
19	22	M	2	26	6	neck	b	lung	IV	0
20	41	M	2	8	6	lung	b	rib	IV	0
21	39	M	1	37	7.6	T-spine	b	rib, other vertebra	IV	
22	33	F	2	28	1	forearm	a	-	IIa	
23	49	M	2	22	10.5	knee	b	-	III	
24	46	F	2	17	4	upper arm	a	-	IIa	
25	45	F	2	14	4.5	lung	b	-	IIa	
26	40	F	1	12	1.5	forearm	a	-	IIa	
27	16	M	2	12	3	wrist	a	-	IIa	
28	50	F	2	162	0.8	thigh	b	-	IIa	
29	28	M	2	151	3	axial(neck)	b	-	IIa	
30	40	M	2	11	13	axial(mediastinum)	b	-	IV	0
31	38	F	2	133	12	Foot	a	-	IIa	
32	37	F	2	181	15	thigh	b	-	III	
33	28	F	1	115	6.3	thigh	b	-	III	0
34	27	M	2	4	8	axial(peritoneum)	a	peritoneal seeding	IV	0
35	39	M	2	8	5	axial(lung)	a	pleura,lymph node	IV	
36	43	F	2	17	12	axial(vagina)	a	peritoneal seeding	IV	

현을 정상 조직과 비교 분석하여, TLE1이 종양에서 특이적으로 발현되는 새로운 종양의 표지자로의 요건을 충족하는 지 알아보았고, 또한 이 발현의 정도가 환자의 예후에 어떤 영향을 미치는지 알아보았다.

저자들의 분석 결과 대부분(97%)의 종양에서 TLE1을 발현하고 있었고, 이 종양과 그 기원이 같은 것 추정되는 간엽세포 즉 근육 조직, 말초 신경 조직, 골 조직, 섬유 조직, 그리고 지방 조직에서는 그 발현이 관찰되지 않았다. 그러나, 세포의 분화가 활발한 혈관의 내피 세포와 상피 조직에서는 중등도 이하의 TLE1의 발현이 관찰되었다. 이는 TLE1은 정상적으로 미분화 단계의 세포에서 중요한 역할을 하는 것으로 알려진 유전자로서 이 발현은 예상된 바이다. 그러나, 중등도 이상의 발현을 보였던 대부분의 활액막 육종에서와는 달리 정상 미분화 세포에서의 발현 정도는 미약하였다. 이는 TLE1의 과다 발현이 활액막 육종에서 특이적임을 말하며, TLE1이 새로운 표적인자로 사용이 가능할 것임을 시사하는 것이다.

활액막 육종에서의 TLE1의 과다 발현은 다른 종양과도 비교 되는 특이한 소견으로 보고되고 있다¹⁰⁾. 이 둘 연구에 의하면, TLE1의 발현은 활액막 육종에서는 97%의 양성을 보이는 반면, 골육종, 섬유육종, 지방육종, 저등급의 연골육종에서는 음성을 보였고, 신경초종(schwannoma)의 16예 중 5예와 혈관주위세포종(hemangiopericytoma)의 5예 중 2예에서만 양성 소견을 보였다고 한다¹⁰⁾. 그러나, 그 생물학적 의미는 아직 밝혀져 있지 않았다. 다른 문헌에서는 TLE1의 과다 발현이 세포사를 유도하는 BIT/AES 기전을 억제함으로써 세포사를 억제한다고 보고하였다(Fig. 3). Shipp 등은 림프종(lymphoma) 환자에서 TLE1의 발현은 나쁜 예후와 관련 있다고 보고하였다^{3,8)}. 이와 같이 활액막 육종의 항암제와 방사선의 저항성이 이 종양에서 특이적인 TLE1의 과다 발현과 관련이 있을 가능성이 있으며, 이에 대한 심도 있는 연구가 필요할 것으로 사료된다.

저자들은 TLE1의 생물학적 특징과 임상적 연관성을 연구하기 위하여 이 인자의 발현 정도가 환자의 예후에 미치는 영향을 분석하였다. 그 결과 TLE1의 발현의 강도는 환자의 병의 진행 또는 생존률과는 관련이 없는 것으로 분석되었다. 이는 TLE1의 발현이 대부분의 종양에서 고르게 발현되고 있기 때문인

것으로 사료된다.

활액막 육종은 다양한 임상적 경과를 보이는 종양으로 이환된 환자의 예후를 예측하기 위한 많은 연구가 진행되어 왔다. 예후 인자로 여겨지는 요소들은 종양의 크기, 성별, 나이, 조직학적 분화도, 조직학적 형태(monophasic 또는 biphasic), 종양의 위치 등이 고려되고 있으나, 종양의 적은 수로 말미암아, 각 연구들은 서로 일치된 결과를 보이고 있지 않다^{1,5,7)}. Lisle 등은 조직학적 형태, 분화도, 종양의 위치, 크기, 나이, 심지어 절제연의 차이도 환자의 생존률에 영향을 주지 않았다고 보고하고 있다⁷⁾. 저자들의 연구에 의하면 TLE1은 활액막 육종에서 특이적인 발현을 보이지만, 그 발현의 강도는 예후와 관련이 없었다. 그러나, 정상 조직에서는 그 발현의 정도가 매우 낮아 TLE1은 이 종양의 발생과 밀접한 관련이 있음을 알 수 있었다.

결 론

저자들은 이 연구를 통하여 TLE1이 정상 조직과 비교하여 대부분의 활액막 육종에서 과다 발현됨을 확인할 수 있었고, 활액막 육종간의 TLE1의 발현 정도와 환자의 예후에는 상관관계를 보이지 않았다. 위와 같이 TLE1은 활액막 육종에서 고르게 분포되는 새로운 종양표지자임을 확인할 수 있었다. 그러므로, TLE1은 향후 활액막 육종의 진단에 효과적으로 사용될 수 있을 것으로 생각되며, 정상 조직에서의 발현도가 낮으므로 종양의 표적 치료시의 좋은 target으로 사용될 수 있는 새로운 인자로 생각된다.

REFERENCES

- 1) Bergh P, Meis-Kindblom JM, Gherlinzoni F, et al.: Synovial sarcoma: identification of low and high risk groups. *Cancer*, 85: 2596-2607, 1999.
- 2) Chen G, Courey AJ: Groucho/TLE family proteins and transcriptional repression. *Gene*, 249: 1-16, 2000.
- 3) Gasperowicz M, Otto F: Mammalian Groucho homologs: redundancy or specificity? *J Cell Biochem*, 95: 670-687, 2005.
- 4) Jan, Y, Matter M, Pai JT, et al.: A mitochondrial protein, Bit1, mediates apoptosis regulated by integrins and Groucho/TLE corepressors. *Cell*, 116:

- 751-762, 2004.
- 5) **Ladanyi M, Antonescu CR, Leung DH, et al.:** Impact of SYT-SSX fusion type on the clinical behavior of synovial sarcoma: a multi-institutional retrospective study of 243 patients, *Cancer res*, 62: 135-140, 2002.
 - 6) **Lewis JJ, Antonescu CR, Leung DH, et al.:** Synovial sarcoma: a multivariate analysis of prognostic factors in 112 patients with primary localized tumors of the extremity. *J Clin Oncol*. 18: 2087-2094, 2000.
 - 7) **Lisle JW, Eary JF, O' Sullivan J, Conrad EU:** Risk Assessment Based on FDG-PET Imaging in Patients with Synovial Sarcoma. *Clin Orthop Relat Res*, published online 02 Dec, 2008.
 - 8) **Shipp MA, Ross KN, Tamayo P, et al.:** Diffuse large B-cell lymphoma outcome prediction by gene-expression profiling and supervised machine learning. *Nat Med*, 8: 68-74, 2002.
 - 9) **Skytting B:** Synovial sarcoma. A Scandinavian Sarcoma Group project. *Acta Orthop Scand Suppl*, 291: 1-28, 2000.
 - 10) **Terry J, Saito T, Subramanian S, et al.:** TLE1 as a diagnostic immunohistochemical marker for synovial sarcoma emerging from gene expression profiling studies, *Am J Surg Pathol*, 31: 240-246, 2007.

Abstract

TLE1: A New Molecular Target of Synovial Sarcoma

Eun Yun Cho, M.D.*, Dong Wook Kim, M.D., Sung Wook Seo, M.D.

The Department of Orthopaedic Surgery and Department of Pathology,
Samsung Medical Center, Sungkyunkwan University School of Medicine, Seoul, Korea*

Purpose: This study was aimed to assess TLE1 as a target molecule of synovial sarcoma.

Method: We obtained tissue samples and clinical data from 36 patients who were diagnosed and treated for synovial sarcoma in our hospital. Immunohistochemical staining was performed to detect the expression of TLE1 in synovial sarcoma and normal tissues such as fat, skeletal muscle, peripheral nerve, vascular endothelium, and epithelium. Univariate survival analysis was performed to find whether overexpression of TLE1 is correlated to poor prognosis.

Results: TLE1 was expressed in 35 (97%) cases (grade 1 was 5 cases, grade 2 was 28 cases, grade 3 was 2 cases.). Normal tissues from mesenchymal origin did not express TLE1. However, epithelial and endothelial cells showed weak expression (grade 1) of TLE1. The level of TLE1 expression did not have any prognostic significance according to univariate survival analysis.

Conclusion: TLE1 may be a new molecular target of synovial sarcoma that differentiates synovial sarcoma from normal mesenchymal cells

Key Words: TLE1, Synovial sarcoma, Molecular target

Address reprint requests to

Sung Wook Seo, M.D.

Department of Orthopaedic Surgery, Samsung Medical Center, Sungkyunkwan
University School of Medicine, 50 Ilwon-Dong, Kangnam-Ku, Seoul, 135-710, Korea
TEL: 82-2-3410-1229, FAX: 82-2-3410-0061, E-mail: sungwook.seo@samsung.com