

갑상선 유두상미세암종에서 갑상선의 침윤, 다원성 및 경부전이에 대한 Matrix Metalloproteinase 2 및 Tissue Inhibitor of Matrix Metalloproteinase 2 발현의 의의 : 부정적 결과 보고*

울산대학교 의과대학 서울아산병원 이비인후과학교실, ** 병리학교실***

최승호** · 남순열** · 조경자*** · 김상윤**

= Abstract =

Expression of Matrix Metalloproteinase 2 and Tissue Inhibitor of Metalloproteinase 2 in Papillary Microcarcinoma of the Thyroid Gland are Not Related with Extrathyroid Invasion, Multifocality and Lymph Node Metastasis of the Tumor*

Seung-Ho Choi, M.D.,** Soon-Yuhl Nam, M.D.,**
Kyung-Ja Cho, M.D.,*** Sang Yoon Kim, M.D.**

Departments of Otolaryngology** and Pathology,*** Asan Medical Center,
University of Ulsan College of Medicine, Seoul, Korea

Objectives : To investigate the role of MMP-2 and TIMP-2 in the invasion and metastasis of thyroid papillary microcarcinomas.

Materials and Methods : We performed immunohistochemical study on MMP-2 and its tissue inhibitor (TIMP-2) using tissue microarrays containing 2 cores of 40 microPTC and 8 non-neoplastic thyroid tissue. The expression intensity was semiquantitatively scored as -, ±, +1, +2, and +3.

Results : Both MMP-2 and TIMP-2 expression was observed in all tumors (100%) and in 1 of 8 non-neoplastic tissue (12.5%), and the positive staining was restricted to the epithelial cells. In 17 and 23 tumors with or without extrathyroid invasion, respectively, 8 (47%) and 10 (43%) cases showed moderate to strong (+2-3) positivity for MMP-2. TIMP-2 expression was moderate to strong in 13 cases (76%) and 16 cases (70%) in each group. In multifocal and solitary tumors, 3 of 6 (50%) and 11 of 21 (52%) cases showed moderate to strong MMP-2 expression, and 5/6 (83%) and 15/21 (71%) showed moderate to strong TIMP-2 expression.

Conclusion : There is no relationship between MMP-2 or TIMP-2 expression and extrathyroid invasion or tumor multifocality in papillary microcarcinoma of the thyroid gland.

KEY WORDS : papillary carcinoma · Thyroid gland · Matrix metalloproteinases · Immunohistochemistry.

서 론

순간에는 주로 주변 조직으로의 침윤이나 혈관생성이 관련되어있으며 침윤 과정에는 종양 세포의 이동을 위하여 세포외기질(extracellular matrix)을 용해하는 단백질분해효소 일정 영역에 국한되어 있던 종양세포가 퍼지는 결정적 의 발현 및 활성화가 필요하다. Matrix metalloproteinase

*본 연구는 2003년도 아산생명과학연구소 연구비 지원에 의해 이루어진 것임(03-318).

교신저자 : 김상윤, 138-736 서울 송파구 풍납동 388-1 울산대학교 의과대학 서울아산병원 이비인후과학교실

전화 : (02) 3010-3710 · 전송 : (02) 489-2773 E-mail : sykim2@amc.seoul.kr

(MMPs)는 세포외기질 및 기저막을 분해할 수 있는 분비 단백질 또는 막성단백질 (transmembrane protein)이다¹⁾. MMP의 활성화는 전사, 번역, 세포외 활성화 등 몇 가지 수준에서 조절되지만 최종적으로는 tissue inhibitor of matrix metalloproteinase(TIMPs)에 의해 이루어진다. 두경부암에서는 MMP family 중 MMP-1, MMP-2, MMP-9 등이 과발현되며 암세포 침윤의 물리적 장벽인 세포외기질 및 기저막, 특히 제 4형 콜라겐을 분해하고 세포외기질 내 growth factor 및 cytokine에 작용하여 혈관생성을 유도함으로써 종양의 진행에 관여한다²⁾³⁾. 여러 MMP 중에서도 특히 MMP-2가 세포외기질 분해에 중요하여 악성 종양의 침윤과 관계있다고 알려져 있다⁴⁾⁵⁾.

갑상선 유두상암종은 일반적으로 매우 천천히 진행되는 편이지만, 병소의 크기가 작음에도 불구하고 갑상선의 피막을 침범하였거나 림프절 전이를 동반하는 경우가 드물지 않다. 따라서 침윤이나 전이의 위험도를 예측할 수 있다면 치료나 추적 관찰에 매우 도움이 될 수 있다. 갑상선 종양에서 MMP 및 TIMP 발현의 의의에 대해서는 많이 연구되지 않았으나 국소 침윤이나 림프절 전이에 대해 다소 상반된 보고들이 있어 추가적인 연구가 필요한 상황이다⁶⁻⁸⁾. Nakamura 등은 갑상선 암종과 여포성 선종, 정상 갑상선 조직에서 MMP-1, -2, -3, -7, -9 및 -13의 발현을 조사하여 그 중에서도 MMP-2만이 타 조직에 비해 갑상선 암종에서 발현이 증가됨을 보고한 바 있다⁹⁾.

저자들은 1cm 미만의 갑상선 유두상암종에서 MMP-2 및 MMP-2에 특이한 억제 단백질인 TIMP-2의 발현 양상을 알아보고 병리조직학적 소견과의 연관성을 통해 국소 침윤 및 림프절 전이에 있어 MMP-2 및 TIMP-2 발현의 의의를 알아보고자 연구를 시행하였다.

대상 및 방법

1. 대 상

2002년 1월부터 2004년 5월까지 갑상선 유두상암종으로 서울아산병원 이비인후과에서 수술 받은 환자 중 병리조직학적 검사에서 원발병소의 크기가 1cm 이하의 유두상 미세암종이었던 40예를 대상으로 하였으며, 대상 환자의 남녀비는 4 : 36이었고 평균 연령은 48.6세(30~67세)였다. 원발병소의 크기는 최소 0.3cm에서 최대 1cm로 평균 0.73cm였다. 병리조직학적 검사상 40예 중 17예(42.5%)에서 갑상선외 침윤(extrathyroid extension)이 있었다. 갑상선 전절제술 또는 일측 갑상선엽절제술 후 완성 갑상선 절제술이 시행된 27예 중 7예(22.2%)에서 다원성(multifocal) 유두상암종이 있었고, 중심부 경부청소술이 시행된 9예 중 3예(33.3%)에서 림프절 전이가 확인되었다.

양성 병변과 유두상암종의 MMP/TIMP 발현 양상을 비교하기 위하여 양성 여포성 낭종 8예에서도 동일한 염색을 시행하였다.

2. 면역조직화학 염색

10% 완충 포르말린 고정 후 파라핀 포매된 조직으로부터 1예 당 직경 0.6mm의 core를 2 곳씩 채취하여 슬라이드당 80개의 샘플을 가지는 조직 미세배열(tissue microarray)을 제작하였다(Fig. 1). 제작된 조직 미세배열 파라핀 블록을 4um 두께로 박절한 뒤 Ventana 자동화 면역화학염색기를 이용하여 염색을 시행하였다. 일차 항체로는 MMP-2와 TIMP-2에 대한 마우스 단클론성 항체(Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, California, USA, 1 : 50)를 사용하였고 biotin이 함유된 이차 항체와 3,3'-diaminobenzidine tetrachloride(DAB)를 이용하여 발색한 후 hematoxylin으로 대조염색하였다.

3. 판독 및 통계처리

염색의 강도를 음성(-), 미량양성(±), 약양성(+1), 중등도양성(+2), 강양성(+3)의 5등급으로 평가하였고 통계적 검증의 용이성을 위하여 음성/미량양성/약양성 군과 중등도양성/강양성 군으로 나누어 분석하였다. 통계처리는 Windows용 SPSS version 10.0(SPSS Inc., Chicago, USA) 프로그램을 이용하여 Fisher's exact test로 분석하였고 유의수준은 0.05로 하였다.

결 과

총 40예의 미세유두상암종 환자 중 17예(42.5%)에서 갑상선외 침윤이 확인되었다. 갑상선외 침윤이 있었던 군에서 유의하게 남성 환자의 비율이 높았으며($p < 0.05$), 다

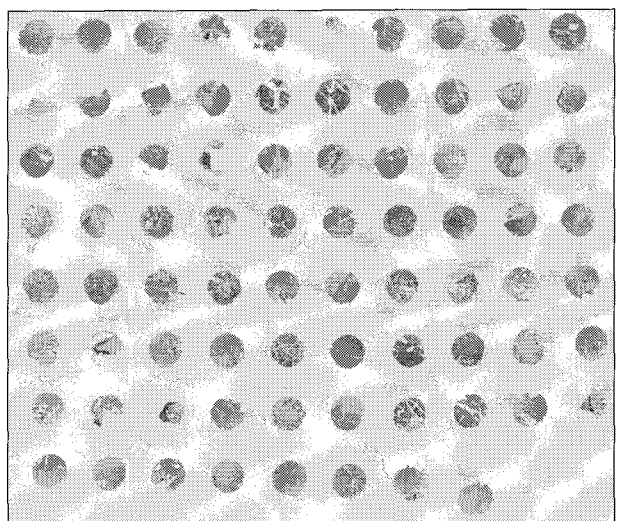


Fig. 1. A low-powered view of a slide with the tissue microarray. Eighty samples were laid on a slide and stained at once.

Table 1. Clinical features of thyroid micropapillary carcinoma patients with or without extrathyroid extension

	Extrathyroid extension	
	Positive	Negative
Age	34-65 (mean 48.1)	30-67 (mean 48.9)
Female/male ratio*	12 : 5	22 : 1
Tumor size (cm)	0.5-1 (mean 0.74)	0.3-1 (mean 0.71)
Multifocality	4/16 (25%)	2/11 (18%)
Lymph node metastasis	2/4 (50%)	1/5 (20%)

*p<0.05

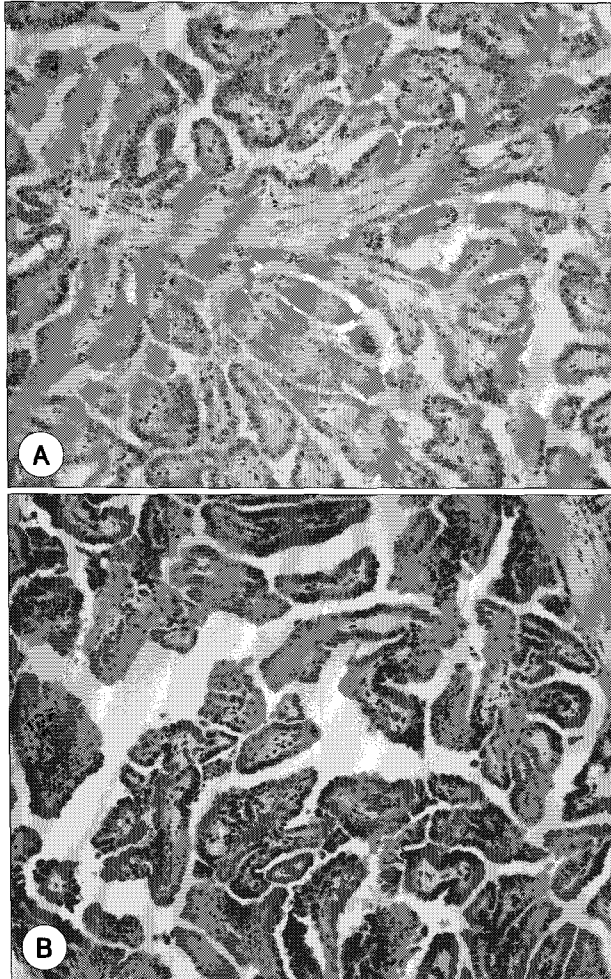


Fig. 2. Expression of MMP-2 and TIMP-2 in thyroid micropapillary carcinomas. A : MMP-2 +2. B : TIMP-2 +3 ($\times 400$).

원성과 중심부 림프절전이라도 갑상선의 침윤이 있었던 군에서 없었던 군에 비해 다소 높은 경향을 보였으나 통계적 유의성은 없었다(Table 1).

MMP-2와 TIMP-2 발현은 전 예의 유두상미세암종 검체에서 관찰되었으나 비종양성 갑상선 조직에서는 8예 중 1예에서만 양성 소견을 보였다. 염색은 상피세포의 세포질에서만 관찰되었고 기질이나 내피세포에서는 관찰되지 않았다(Fig. 2, 3). MMP-2 염색의 강도가 중등도양성 혹은 강양성이었던 비율은 갑상선의 침윤이 있었던 군에서는 47% (8/17), 갑상선의 침윤이 없었던 군에서는 43% (10/23)로

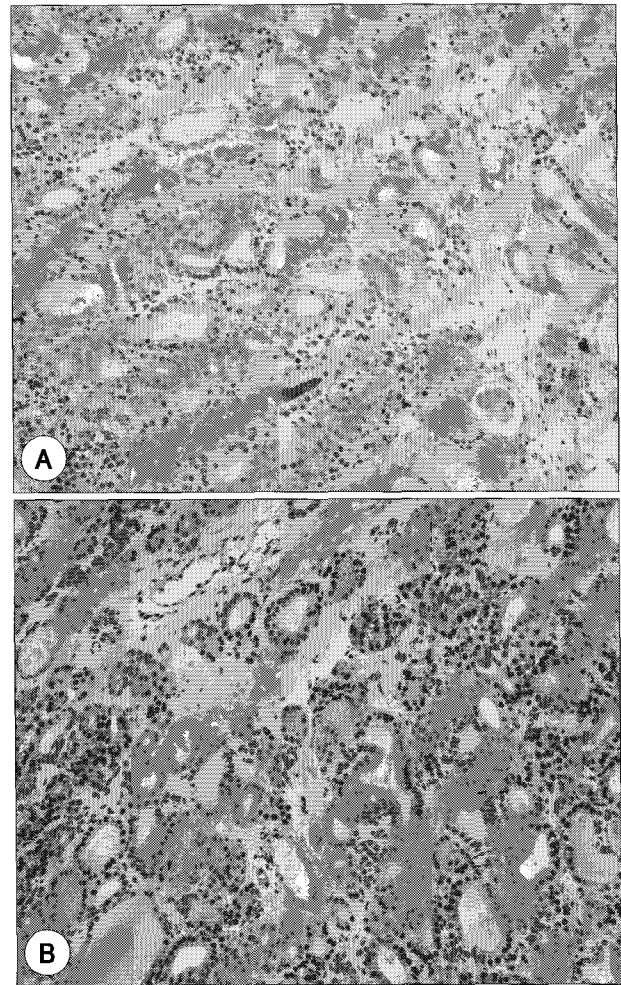


Fig. 3. Expression of MMP-2 and TIMP-2 in a thyroid follicular cell lesion. A : MMP-2 \pm . B : TIMP-2 + ($\times 400$).

Table 2. MMP-2 and TIMP-2 immunohistochemical results with correlation with extrathyroid extension and tumor multifocality

		Extrathyroid extension		Multifocality	
		Positive	Negative	Positive	Negative
MMP-2	\pm	1	1	0	2
	+1	8	12	3	8
	+2	6	8	2	8
	+3	2	2	1	3
TIMP-2	\pm	1	0	0	1
	+1	3	7	1	5
	+2	7	9	4	4
	+3	6	7	1	11

차이가 없었고, TIMP-2에 대해서도 각각 76% (13/17), 70% (16/23)으로 차이가 없었다. 다원성 종양 유무군 간에도 MMP-2, TIMP-2 발현 양상의 차이는 없었다(Table 2). MMP-2와 TIMP-2 모두 중심부 림프절전이가 없었던 3예 중 1예에서 중등도양성 혹은 강양성 염색이 되었고, 중심부 림프절전이가 없었던 6예 중에서는 3예에서 중등도양성 또는 강양성 소견을 보여 중심부 림프절전이 유무

에 따른 발현 양상의 차이는 없는 것으로 나타났다.

고 찰

근래에 경부 초음파검사가 건강 검진에 도입되면서 갑상선 유두상미세암종을 진단하는 예가 증가하고 있다. Pelizzo 등은 갑상선 유두상미세암종 149예에 대한 보고에서 피막 침범은 0.02%에 불과하지만 림프절 전이는 13.4%에서 나타나며 다원성 종양인 경우도 12.1%나 되어 수술 전 갑상선 유두상미세암종으로 진단된 경우에는 갑상선전절제술 및 중심부 경부림프절절제술을 시행하는 것이 바람직하며, 암이 아닌 병리로 수술을 하여 우연히 유두상미세암종이 발견되었고 다원성, 림프절 전이, 피막 침범이 없는 경우에는 재수술이 불필요하다고 하였다¹⁰. 본 연구에서는 총 40예 중 42.5%인 17예에서 갑상선외 침윤이 있어 Pelizzo 등의 보고와 큰 차이를 보였으며 다원성 종양도 22.2%에서 있어 훨씬 높은 빈도를 보였고 증례 수는 적으나 중심부 림프절 전이도 3분의 1에서 나타나 갑상선 유두상미세암종에 대하여 더욱 적극적인 치료가 필요할 것으로 사료되었다.

세포외기질은 조직 및 장기의 발생과 유지에 매우 중요하며 laminin, type I 및 IV collagen, fibronectin, elastin, proteoglycan과 같은 물질의 합성과 분해의 균형에 의해 항상성이 유지된다. Matrix metalloproteinase(MMP)는 종양의 침윤 시 세포외기질의 분해에 필요한 분비 단백질분해효소로서 collagenase, gelatinase, stromelysin 등과 유사하지만 일반적으로 별도로 분류된다¹¹. 여러 MMP 중에서도 MMP-2(72 kDa type IV collagenases, gelatinase A)와 MMP-9(92 kDa type IV collagenases, gelatinase B)이 특히 기저막 분해에 중요하여 유방암¹², 위암¹³ 등 다수의 암에서 국소 침윤과 전이에 관여한다고 알려져 있다. 갑상선암 조직에서 MMP의 분포는 침윤성 종양세포 주변의 간질내 섬유아세포에 국한된다는 보고도 있고¹³⁻¹⁵ 섬유아세포와 종양세포 모두에서 발현된다는 보고도 있으며⁹, 주로 상피세포에서 발현된다는 보고도 있어⁶ 논란이 많은 부분이다. 본 연구에서는 간질이나 혈관 내피세포에서는 MMP-2나 TIMP-2의 발현을 관찰할 수 없었고 종양세포에 발현이 국한되어 Maeta 등⁶의 보고와 일치하였다. 또한 MMP-2와 TIMP-2가 유두상암종에서는 전 예에서 발현되고 여포성 낭종에서는 8예 중 1예에서만 발현되어, 정상 갑상선 조직이나 선종보다 암종에서 MMP-2가 강하게 발현된다는 Nakamura 등⁹의 보고와 유사한 결과를 보였다.

TIMP-2는 MMP-2에 선택적으로 작용하는 억제 단백질이므로 MMP-2의 세포외기질 분해능을 고려하면 TIMP-2는 종양의 기저막 침윤이나 전이를 억제하여야 한다. 실제

로 섬유육종을 이용한 실험에서 TIMP-2가 기저막 침윤을 억제한 보고나¹⁶ retroviral vector를 이용하여 TIMP-2 cDNA를 형질도입함으로써 흑색종 세포주의 성장과 침윤을 억제하였다는 보고가 있다¹⁷. 그러나, 정상 조직보다 암 조직에서 오히려 TIMP-2의 발현이 증가되어 있다는 보고도 있고^{18,19} TIMP 자체가 암세포의 활성도를 높인다는 보고도 있어²⁰ 단순히 MMP와 TIMP간의 불균형으로 종양의 성장과 전이를 설명하기 어렵다. 본 연구에서도 TIMP-2 발현과 MMP-2의 발현 양상이 서로 유사하였으며 피막 침윤이나 중심부 림프절 전이와의 관련성을 발견할 수 없었다. 본 연구가 미세암을 대상으로 한 것임을 고려할 때 MMP, TIMP 등 종양 세포의 특성 보다는 종양의 위치에 따라 피막 침윤이나 림프절 전이 유무가 결정되었을 가능성이 있다. 이를 규명하기 위해서는 초음파나 육안 소견 상 피막에 가까운 미세암 만을 대상으로 분석을 하여야 할 것이지만 증례 수가 적어 시행하지 못하였고 앞으로 추가적인 연구가 필요할 것으로 생각된다.

본 연구에서는 조직 미세배열 기법을 이용하여 80개의 샘플을 하나의 파라핀 블록으로 만들어 염색에 이용함으로써 면역조직화학염색에 소요되는 비용과 시간을 절약할 수 있었다. 조직 미세배열은 경험 있는 병리과 의사에 의해 종양조직만을 정확히 채취해야 하고 종양부와 정상부, 변연부 등 넓은 영역의 조직을 관찰할 수 없다는 단점이 있으나 본 연구와 같이 관심 조직에서의 발현 정도만을 평가하는 데는 지장이 없으며 판독과 슬라이드 관리에서도 매우 편리하여 유용한 방법으로 생각되었다.

결 론

갑상선 유두상미세암종에서 MMP-2와 TIMP-2를 이용하여 예후 인자인 갑상선외 침윤, 다원성 종양, 림프절 전이 여부를 예측할 수 있는지 알아보고자 하였으나 전 예에서 발현이 나타나고 발현의 강도 역시 비교군간 유사하여 검사의 유의성을 찾을 수 없었다. 일반적으로 종양의 진행에 있어 MMP에 의한 기저막 단백질의 분해가 중요하지만, 갑상선 유두상미세암종에서는 갑상선외 침윤, 다원성 종양 및 림프절 전이에 대한 MMP-2 및 TIMP-2의 영향이 크지 않음을 알 수 있다.

중심 단어 : 유두상암종 · 갑상선 · Matrix metalloproteinases · 면역조직화학염색.

References

- 1) Chambers AF, Matrisian LM: *Changing views of the role of*

- matrix metalloproteinases in metastasis. J Natl Cancer Inst. 1997; 89 (17):1260-270*
- 2) Kurahara S, Shinohara M, Ikebe T, et al: *Expression of MMPs, MT-MMP, and TIMPs in squamous cell carcinoma of the oral cavity: correlations with tumor invasion and metastasis. Head Neck. 1999;21 (7):627-638*
 - 3) Imanishi Y, Fujii M, Tokumaru Y, et al: *Clinical significance of expression of membrane type 1 matrix metalloproteinase and matrix metalloproteinase-2 in human head and neck squamous cell carcinoma. Hum Pathol. 2000;31 (8):895-904*
 - 4) Stetler-Stevenson WG, Aznavoorian S, Liotta LA: *Tumor cell interactions with the extracellular matrix during invasion and metastasis. Annu Rev Cell Biol. 1993;9:541-573*
 - 5) Nomura H, Fujimoto N, Seiki M, Mai M, Okada Y: *Enhanced production of matrix metalloproteinases and activation of matrix metalloproteinase 2 (gelatinase A) in human gastric carcinomas. Int J Cancer. 1996;69 (1):9-16*
 - 6) Maeta H, Ohgi S, Terada T: *Protein expression of matrix metalloproteinases 2 and 9 and tissue inhibitors of metalloproteinase 1 and 2 in papillary thyroid carcinomas. Virchows Arch. 2001;438 (2):121-128*
 - 7) Korem S, Kraiem Z, Shiloni E, Yehezkel O, Sadeh O, Resnick MB: *Increased expression of matrix metalloproteinase-2: a diagnostic marker but not prognostic marker of papillary thyroid carcinoma. Isr Med Assoc J. 2002;4 (4):247-251*
 - 8) Baldini E, Toller M, Graziano FM, Russo FP, Pepe M, Biordi L, et al: *Expression of matrix metalloproteinases and their specific inhibitors in normal and different human thyroid tumor cell lines. Thyroid. 2004;14 (11):881-888*
 - 9) Nakamura H, Ueno H, Yamashita K, et al: *Enhanced production and activation of progelatinase A mediated by membrane-type 1 matrix metalloproteinase in human papillary thyroid carcinomas. Cancer Res. 1999;59 (2):467-473*
 - 10) Pelizzo MR, Boschin IM, Toniato A, et al: *Natural history, diagnosis, treatment and outcome of papillary thyroid microcarcinoma (PTMC): a mono-institutional 12-year experience. Nucl Med Commun. 2004;25 (6):547-552*
 - 11) Matrisian LM: *The matrix-degrading metalloproteinases. Bioessays. 1992;14 (7):455-463*
 - 12) Azzam HS, Arand G, Lippman ME, Thompson EW: *Association of MMP-2 activation potential with metastatic progression in human breast cancer cell lines independent of MMP-2 production. J Natl Cancer Inst. 1993;85 (21):1758-1764*
 - 13) Kameyama K: *Expression of MMP-1 in the capsule of thyroid cancer--relationship with invasiveness. Pathol Res Pract. 1996; 192 (1):20-26*
 - 14) Zedenius J, Stahle-Backdahl M, Enberg U, Grimelius L, Larsson C, Wallin G, et al: *Stromal fibroblasts adjacent to invasive thyroid tumors: expression of gelatinase A but not stromelysin 3 mRNA. World J Surg. 1996;20 (1):101-106*
 - 15) Campo E, Merino MJ, Liotta L, Neumann R, Stetler-Stevenson W: *Distribution of the 72-kd type IV collagenase in nonneoplastic and neoplastic thyroid tissue. Hum Pathol. 1992;23 (12): 1395-1401*
 - 16) Albini A, Melchiori A, Santi L, Liotta LA, Brown PD, Stetler-Stevenson WG: *Tumor cell invasion inhibited by TIMP-2. J Natl Cancer Inst. 1991;83 (11):775-779*
 - 17) Imren S, Kohn DB, Shimada H, Blavier L, DeClerck YA: *Overexpression of tissue inhibitor of metalloproteinases-2 retroviral-mediated gene transfer in vivo inhibits tumor growth and invasion. Cancer Res. 1996;56 (13):2891-2895*
 - 18) Yu AE, Hewitt RE, Kleiner DE, Stetler-Stevenson WG: *Molecular regulation of cellular invasion--role of gelatinase A and TIMP-2. Biochem Cell Biol. 1996;74 (6):823-831*
 - 19) Grignon DJ, Sakr W, Toth M, et al: *High levels of tissue inhibitor of metalloproteinase-2 (TIMP-2) expression are associated with poor outcome in invasive bladder cancer. Cancer Res. 1996; 56 (7):1654-1659*
 - 20) Visse R, Nagase H: *Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. Circ Res. 2003;92 (8):827-839*