



저작자표시 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.
- 이차적 저작물을 작성할 수 있습니다.
- 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#) 

2009년 2월

석사학위논문

암줄기세포 표지자 CD133과
림프절 전이의 관계

조선대학교 대학원

의학과

강 차 영

암줄기세포 표지자 CD133과
림프절 전이의 관계

Correlation of cancer stem cell marker CD133 and
lymph node metastasis

2009년 2월 25일

조선대학교 대학원
의학과

강 차 영

암줄기세포 표지자 CD133과
림프절 전이의 관계

지도교수 도 남 용

이 논문을 의학석사학위신청 논문으로 제출함.

2008년 10월 일

조선대학교 대학원

의학과

강 차 영

강차영의 석사학위논문을 인준함

위원장 조선대학교 교수 임 성 철 인

위 원 조선대학교 교수 조 성 일 인

위 원 조선대학교 교수 도 남 용 인

2008년 11월 일

조선대학교 대학원

목 차

표목차.....	i
도목차.....	ii
Abstract.....	1
서론.....	2
재료 및 방법.....	4
결과.....	7
고찰.....	9
결론.....	13
참고문헌.....	14
표 및 사진부도.....	18

표목차

Table 1. Characteristics of 118 patients with head and neck squamous cell carcinoma.....	18
Table 2. Comparison of CD133 expression in head and neck squamous cell carcinoma according to the primary tumor site, gender, tumor stage and differentiation.....	19
Table 3. Comparison of CD133 expression in the primary tumor site according to the nodal status in head and neck squamous cell carcinoma.....	20
Table 4. Comparison of CD133 expression between primary tumor site and metastatic lymph node in node positive head and neck squamous cell carcinoma.....	21

도 목 차

- Fig. 1. Immunohistochemical staining for CD133 in primary head and neck squamous cell carcinoma with lymph node metastasis. Poorly differentiated squamous cell carcinoma showed 'high expression' of CD133 in the cytoplasm.....22
- Fig. 2. Immunohistochemical staining for CD133 in primary head and neck squamous cell carcinoma without lymph node metastasis. Well differentiated squamous cell carcinoma showed 'high expression' of CD133 in the cytoplasm.....23
- Fig. 3. Immunohistochemical staining for CD133 in metastatic squamous cell carcinoma of the cervical lymph node. Poorly differentiated metastatic squamous cell carcinoma showed 'high expression' of CD133 the cytoplasm.....24

Abstract

Correlation of cancer stem cell marker CD133 and lymph node metastasis

Kang, Cha-Young

Advisor: Prof. Do, Nam-Yong, Ph.D.

Department of Medicine,

Graduate School of Chosun University

Head and neck squamous cell carcinomas (HNSCC) are characterized by a marked propensity for local invasion and cervical lymph node metastasis. CD133, being normally expressed on the surface of hematopoietic stem cells, has recently been suggested as a marker of cancer stem cells in several malignancies. However, little is known about the roles of CD133 in HNSCC. The aim of this study was to investigate the expression of CD133 in tumor samples of 118 HNSCC patients, and to study a possible correlation of cancer stem cell and lymph node metastasis. The expression of CD133 was analyzed in the same paraffin embedded tissue by semiquantitative immunohistochemical staining. There were positive expression in 100% of CD133 in HNSCC. High expression of CD133 had statistically significant correlation with tumor differentiation, clinical stage and lymph node metastasis ($p < 0.005$, $p < 0.05$, $p < 0.05$, respectively). These results indicate that high expression of CD133 might be predictive of more aggressive behavior in HNSCC.

Key Words: CD133, Head and neck cancer, Squamous cell carcinoma, Cancer stem cell, Metastasis

서 론

두경부에 발생하는 암은 90% 이상이 편평세포암종으로 종양의 크기, 침범부위 및 전이 여부 등이 예후에 큰 영향을 미친다고 알려져 있다. 두경부 편평세포암종은 혈행성 전이는 적지만 림프절 전이가 많고 림프절 전이가 일어난 후 원격 전이가 일어난다. 따라서 두경부 편평세포암종에서 림프절 전이는 치료 실패의 주된 원인이라고 알려져 있다.

암의 발생은 DNA 상에서 비전형적으로 발생하는 유전자 변이(random mutation)나 후생학적 발생(epigenetic alteration)의 순차적 진행에 의해 세포의 성장, 생존 및 암세포의 여러 특성과 관련이 있는 유전자에 영향을 주어 일어난다고 알려져 있다. 종양세포들 중에는 자가재생(self-renewal)과 종양발생(tumor initiation)을 할 수 있는 능력이 증가된 세포가 소수 존재하는데 이들을 암줄기세포(cancer stem cell, CSC)라 칭하며 종양조직의 성장을 유지하는데 관여한다고 주장되고 있다(Yin et al., 1997).

암이 줄기세포의 이상으로부터 기인한다는 학설은 1997년 Bonnet & Dick 등에 의해 백혈병(acute myeloid leukemia)이 $CD34^+/CD38^-$ 표식인자를 갖는 원시조혈세포(primitive hematopoietic cells)로부터 유래한다는 보고에서 암줄기세포(cancer stem cell)의 존재가 밝혀진 이래로(Bonnet & Dick, 1997), 유방암(Al Hajj, 2003), 뇌종양(Singh et al, 2004; Singh et al, 2003), 대장암(O'Brien et al, 2007; Ricci-Vitiani et al, 2007), 전립선암, 흑색종(Schatton et al, 2008) 순으로 고형암(solid tumor)에서도 암줄기세포가 존재한다고 알려져 있다. 최근에는 추가적인 여러 분자생물학적 표지자에 대한 연구가 활발하게 진행되면서 암유전자 및 이들의 활성화인자, 암억제유전자 및 이들의 억제인자들에 대한 연구와 더불어 종양세포의 침습 및 전이에 관련된 각종인자와 치료내성과 관련된 인자들에 대한 연구가 진행되고 있다.

CD133(prominin-1)은 원래 CD34 양성인 조혈줄기세포(hematopoietic stem cell)에 존재하는 세포표면 항원(cell surface antigen)으로 동정되었으나 이의 기능에 대해서는 잘 알려져 있지 않다(Yin et al., 1997). 이는 또한 혈관내피 세포 줄기세포, 신경 및 교세포 줄기세포, 신장 및 전립선 상피 줄기세포 등에도 존재하는 것으로 알려져 있다(Uchida et al., 2000; Richardson et al., 2004; Bussolati et al., 2005). 암줄기세포를 동정하는 표지자로 CD133이 널리 사용되고 있는데(Singh et al., 2003; Singh et al., 2004; Zhou et al., 2007), 두경부 편평세포암종 조직을 대상으로 한 연구는 아직 없다.

이에 저자는 두경부 편평세포암종과 경부 전이 림프절에서 면역조직화학적 염색으로 CD133의 발현을 검토하여 CD133의 발현과 임상병리학적 인자, 림프절 전이 등과 관련이 있는지를 알아보고 이를 토대로 두경부 편평세포암종의 병태생리 특히 종양의 진행, 전이에 대한 이해와 암줄기세포의 역할에 대한 지견을 확보하고자 본 연구를 시행하였다.

재료 및 방법

1. 연구재료

본 연구에 사용된 증례는 1994년부터 2008년 까지 조선대학교 부속병원 이비인후과에서 두경부 편평세포암종으로 절제술을 시행한 환자 중 림프절 전이가 초래된 환자 78예, 림프절 전이가 초래되지 않은 환자 40예를 대상으로 하였다. 림프절 전이가 초래되지 않은 환자군은 임상병기 I기(17예), II기(23예)에 국한된 조기암을 대상으로 제한하였다. 원발부위별 분포를 살펴보면 후두암 57예, 인두암 41예, 구강암 20예였다. 병기는 American Joint Committee on Cancer(Greene et al., 2002)에 따라서 분류하였다.

2. 연구방법

1) 병리학적 분류 및 광학현미경적 검사

환자의 임상기록과 병리과 조직 슬라이드 파일을 대상으로 후두, 인두, 구강 각 부위의 병변을 재검토하여 원발부위 및 림프절 전이 유무를 재확인하고, 연구목적에 부합되는 대표적인 부위를 선택하여 면역조직화학적 검사를 위한 슬라이드를 제작하였다. 림프절 전이군은 대표적인 원발병소와 전이가 초래된 림프절 블록을 선택하였다.

2) 면역조직화학적 염색

10% 완충 중성 포르말린에 고정 후 제작한 파라핀 포매 조직을 4 μ m 두께로 박절하여 X-traTM슬라이드(Surgipath, Richmond, USA)에 부착하여 xylene으로 탈 파라핀한 뒤 무수 알코올, 90%, 75% 및 50% 에탄올에 각

각 2분씩 처리하여 흡수시켰다. 항원성 회복을 위하여 citrate 완충액 (10mM, pH 6.0)에 슬라이드를 담가 전자오븐에 15분간 끓인 후 실온에 방치시켜 20분간 식힌 후 50mM Tris 완충용액(TBS, pH 7.5)으로 수세하였다. 조직절편내의 내인성 과산화효소의 활성을 억제하기 위하여 0.3% hydrogen peroxide-methanol에 10분간 처리 후 증류수로 세척하고 Ultra V block(Lab Vision, Fremont, CA, USA)을 실온에서 10분간 반응시킨 뒤 일차항체인 CD133 goat polyclonal antibody (C-19, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA, 1:50 희석)를 37°C에서 1시간 반응시켰다. 이후 Tris 완충액으로 세척하고 Polink-2 plus HRP anti-goat DAB detection kit(Golden Bridge International, Mukilteo, WA, USA)를 이용하여 염색하였다. Mayer's hematoxylin으로 대조염색을 시행하고, universal mount(Research Genetics, Huntsville, AL, USA)로 봉입하였다.

매 염색시 CD133의 양성대조는 조기태반 조직을 이용하였으며, 음성 대조군은 1차 항체를 정상 goat serum으로 대체한 것으로 염색하였다.

3) 염색 결과의 판정

CD133에 대한 염색은 세포질내 염색반응을 보이는 경우 양성반응으로 판정하였는데, 염색정도 판정은 고배율 시야(400배) 4-5곳을 중첩된 부위 없이 임의 선택하여 내피세포를 제외한 세포중 양성반응을 보이는 세포의 수를 백분율로 환산하였다. CD133 발현증가의 의의에 대한 통계학적 분석을 위하여 염색정도를 CD133 발현 중간값(38.8%)을 기준으로 '높은(high) 발현'과 '낮은(low) 발현'으로 구분하였는데 CD133 발현 백분율이 중간값과 같거나 크면 '높은 발현', 작으면 '낮은 발현'으로 정하였다(Yin et al., 2007).

4) 통계학적 분석

임상 병기 및 조직학적 분화도 간의 CD133 발현의 차이, 림프절 전이 유무에 따른 원발병소의 CD133 발현 차이 및 림프절 전이군의 경우 원발병소와 전이병소간 CD133 발현차이에 대한 통계학적 분석은 SPSS (statistical package for the social sciences), Windows, version 12(SPSS, Korea)로 Spearman 상관관계분석법과 χ^2 test로 검정하였다. 그리고, 이들의 통계학적 유의 수준은 p 값 < 0.05로 하였다.

결 과

1. 임상 및 조직학적 소견

대상환자 총 118명의 연령은 26~84세(평균; 59.8세)였으며, 남녀 성비는 8:1(105:13)이었다. 임상병기에 따른 분류는 I기 17예, II기 23예, III기 34예, IV기 44예였으며, 이들 중 78예(66.1%)는 림프절 전이군, 40예(33.9%)는 림프절 비전이군이였다(Table 1).

2. *CD133*의 면역조직화학적 발현 양상

*CD133*은 모든 증례에서 세포질 또는 세포막 염색을 보이는 양성 세포가 관찰되었는데, 종양세포는 물론 드물게 내피세포 및 간질조직 세포에서도 양성소견이 관찰되었다(Figs. 1-3). 양성세포 백분율의 중간값이 38.8%로 확인되어 *CD133* 발현 백분율이 38.8%와 같거나 크면 '높은 발현', 38.8% 미만은 '낮은 발현'으로 분류하였다. 림프절 전이 유무와 상관없이 원발병소를 기준으로 낮은 발현 56예(47.5%), 높은 발현 62예(52.5%)였다.

3. 임상 및 병리학적 인자와 *CD133* 발현 비교

종양의 임상적 병기와 연관성은 조기병기(I, II기)에서는 낮은 발현이 25예(62.5%), 진행된 병기(III, IV기)에서는 높은 발현이 47예(60.3%)로서 진행된 병기에서 *CD133*은 유의하게 높은 발현을 보였다($p<0.05$). 조직학적 분화도와와의 관계는 고분화암은 낮은 발현 32예(68.1%), 높은 발현 15예(31.9%)였으며, 중등도 분화암은 높은 발현 42예(65.6%)였으며, 미분화암은 높은 발현 5예(71.4%)로서 분화도가 낮을수록 유의하게 높은 발현을 보였다($p<0.05$)(Table 2).

4. 림프절 전이 유무에 따른 원발병소 *CD133* 발현 비교

림프절 전이가 있는 군과 없는 군을 대상으로 *CD133* 발현 정도를 비교한 결과 전이가 있는 군(Figs. 1)은 높은 발현 51예(65.4%), 전이가 없는 군(Figs. 2)은 11예(27.5%)로 통계학적으로 유의한 차이를 보였다($p < 0.05$). 즉 림프절 전이가 초래된 군에서 *CD133*이 유의하게 높은 발현을 보였다(Table 3).

5. 림프절 전이군에서 원발병소와 전이병소간 *CD133* 발현 비교

림프절 전이가 초래된 군(78예)을 대상으로 원발병소와 전이병소의 *CD133* 발현 정도를 비교한 결과 원발병소의 높은 발현은 51예(65.4%), 전이된 림프절(Figs. 3)의 높은 발현은 72예(92.3%)로서 통계학적으로 유의한 차이를 보였다($p < 0.01$). 즉 림프절 전이가 초래된 군에서 *CD133*은 원발병소에 비하여 전이병소에서 유의하게 높은 발현을 보였다(Table 4).

고찰

일반적으로 정상세포가 암세포로 전환되는 과정은 유전자 변형이 여러 단계를 거쳐 이루어지는 것이기 때문에(multi-step tumorigenesis) 짧게는 수년부터 길게는 수십년을 필요로 하는 매우 복잡한 과정이다. 암의 생성은 DNA의 변형에 의해 발생하고 분화된 세포에서 종양억제유전자와 종양유전자 등의 유전자 변이(random mutation) 혹은 후생학적 발생(epigenetic alteration)의 순차적 진행에 의해 발생한다는 것이 지금까지의 지견이다(Weinberg, 2005). 그러나 인간종양줄기세포에 대한 생물학적 분석이 소개되면서 종양 줄기세포로 인해 대부분의 종양 유형이 비균질적이고 서로 다른 표현형과 증식력, 악성변화 가능성 등을 나타낸다고 알려졌다(Hamburger & Salmon, 1977).

1997년 Dick 등이 백혈병(acute myeloid leukemia)이 $CD34^+/CD38^-$ 표지인자를 갖는 원시조혈세포(primitive hematopoietic cells)로부터 유래한 암임을 보고 하면서 암이 줄기 세포의 이상으로부터 기인되었다고 생각되면서 이에 대한 연구가 시작되었다. Al Hajj 등은 줄기 세포의 특이적 표면단백질을 표지분석법을 통해 분석하여 유방암조직에서 유방암줄기세포 표지인자를 발견하고, 선별된 세포들에서 종양형성능을 비교하여 종양형성능력이 탁월한 일부의 세포가 존재함을 발견하고 이들을 암줄기세포(cancer stem cell)라고 명명하였다.

이런 암줄기 세포를 다른 암세포들과 구별하기 위해서는 암줄기세포만의 표지자(marker)가 필요하다. 교모세포종의 암줄기세포는 특이적으로 CD133을 발현한다고 알려져 있다. 사람의 교모세포종을 처리하여 CD133을 발현하는 암세포와 발현하지 않는 암세포를 분리한 결과 전체 암세포 중 5%~30%에서 CD133이 발현하였다. 이를 면역력이 없는 nude mice 뇌에

주입하였을 때, CD133을 발현하는 암세포들은 100 개를 주입하였을 때 같은 병리학적 특성을 갖는 종양을 형성하였으나, CD133을 발현하지 않는 암세포들은 100,000 개를 주입하였으나 암을 유발하지 않았다고 하며 CD133을 교모세포종의 암줄기세포 표지자로 사용할 수 있을 것이라고 하였다(Singh et al, 2004). 최근 연구에 의하면 여러 암 종류들에서 특이 표식인자를 발현하는 암줄기세포가 보고되었는데 두경부 편평세포암은 CD44⁺(Prince et al, 2007), 폐암은 CD133⁺(Eramo et al, 2008), 췌장암은 CD44⁺/CD24⁺(Li et al, 2007)인 세포로 다양한 암조직에 존재하며 이들이 암의 생성에 중요한 역할을 수행하고 있음이 확인되었다.

CD133은 조혈줄기세포(hematopoietic stem cell), 혈관내피전구세포(endothelial progenitors), 진피기원 줄기세포(dermal derived stem cell) 등에서 발현되는 줄기세포 표지자로서(Yin et al., 1997), 암줄기세포를 동정하는 표지자로 널리 사용되고 있는데 이들은 정상적인 줄기세포의 많은 특성들을 지니지만 재발, 전이 및 다약물 내성 등과 관련이 된다는 보고가 있다(Mohan et al., 2006; Klein et al., 2007; Mangiola et al., 2007; Ma et al., 2008).

암줄기세포와 관련된 연구는 일부 장기에 국한되어 보고된 수준인데 대부분 재발, 전이, 조직학적 분화도 및 임상병기와 유의한 관련이 있어 환자의 불량한 예후를 결정짓는 인자로 보고되고 있다(Mehra et al., 2006; Hermann et al., 2007; Beier et al., 2008).

Klein 등이 일반 모반과 악성흑색종에서 CD133의 발현에 대한 연구에 의하면 악성흑색종에서 염색된 세포의 백분율과 염색강도가 증가되어 보다 침습적인 악성흑색종일수록 줄기세포 표현형을 가진 세포를 포함할 가능성이 높다고 주장하였다. Kang 등은 피부암에서 전이 위험도가 높은 종양일수록 CD133이 높게 발현되어 종양의 침습성 및 악성도를 나타내는 표지자로서 적합하다고 하였다. 또한 췌장암에서 CD133 발현은 VEGF-C의 발현과

유의한 상관관계가 있다는 보고도 있다(Maeda et al., 2008).

본 연구에서도 CD133은 모든 증례에서 세포질 또는 세포막 염색을 보이는 양성 세포가 관찰되었고(Figs. 1-3) 림프절 전이 유무와 상관없이 원발 병소를 기준으로 낮은 발현 56예(47.5%), 높은 발현 62예(52.5%)로 통계적으로 유의하게 높은 발현이 우세하였고 진행된 병기(III, IV)와 조직학적 분화도가 낮을수록(Table 2), 그리고 림프절 전이가 초래된 군(Table 3)에서 CD133이 유의하게 높은 발현을 보인 것으로 보아 종양의 분화도, 임상 병기 및 림프절 전이 유무와 유의한 상관관계가 있는 것으로 나타났으며 CD133 발현세포가 증가할수록 환자의 불량한 예후가 예측된다.

최근 연구에 의하면 CD133 양성 뇌종양 줄기세포를 방사선으로 치료시 DNA 손상 검분소 반응(damage check point response)의 활성화를 통해 DNA repair 기능을 증가 시킴으로서 CD133 음성 뇌종양세포에 비하여 방사선 치료에 대하여 훨씬 높은 내성을 갖는다고 하였다(Bao et al, 2006). 또한 이 암줄기세포들은 방사선은 물론 항암제 치료에 대한 내성에도 관여하고 있으며, 결국 암줄기세포 표적치료로 항암내성을 극복할 수 있다는 보고가 많이 발표되고 있다. 그러나 일반적으로 암줄기세포는 전체 암세포들 중에서 차지하는 수가 매우 적으나 특정암에서는 암줄기세포로 생각되는 표식인자를 갖는 세포의 비율이 과도하게 많이 존재하여 암줄기세포 특이적 항암제의 개발도 기존의 항암제와 비교해 크게 다르지 않을 가능성을 나타낸다. 또한 뇌암의 CD133이나 유방암의 CD44 등 일부 암줄기세포 특이적 표식인자들이 다른 체세포에서도 발현됨으로써 암줄기세포 특이적 표식인자의 존재 확립이 암줄기세포 특이 항암제의 개발에 앞서 정립되어야 할 것으로 생각된다.

하지만 최근 CD133 발현이 줄기세포에만 국한되지 않으며 CD133 양성 은 물론 음성인 전이 대장암세포도 종양을 일으킨다는 연구(Shmelkov et al., 2008)나 CD133을 발현하는 암세포는 교모세포종 환자에 따라 1%에서

50%까지 매우 다양하며, CD133을 발현하는 암세포가 1% 이하인 환자에서는 CD133을 발현하지 않는 세포도 nude mice의 뇌에서 암을 생성한다는 보고가 있다(Beier et al, 2007). 따라서 환자마다 종양의 암줄기세포가 각기 다른 표지자와 다른 특성을 가지고 있을 가능성이 있으므로 이에 대한 추가적인 연구가 계속되어져야 할 것으로 판단된다.

결 론

두경부 편평세포암종에서 암줄기세포 표지자로 알려진 CD133의 발현이 종양의 각종 임상병리학적 인자들에 어떠한 영향을 미치는지 알아보고, 이를 토대로 두경부 편평세포암종의 병태생리 특히 종양의 진행, 전이에 대한 이해와 암 줄기세포의 역할에 대한 지견을 확보하고자 두경부에 발생한 편평세포암종 118예를 대상으로 면역조직화학 염색을 시행하고 분석하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. CD133은 모든 증례에서 세포질에서 양성 세포가 관찰되었는데 림프절 전이 유무와 상관없이 원발병소를 기준으로 '낮은 발현' 56예(47.5%), '높은 발현' 62예(52.5%)였다.
2. 임상 병리학적 인자와 CD133 발현과의 관계는 진행된 병기(III, IV)와 조직학적 분화도가 낮을수록 유의하게 '높은 발현'을 보였다.
3. 림프절 전이가 있는 군의 원발병소가 유의하게 '높은 발현'율을 보였다.
4. 림프절 전이군에서 원발병소와 비교하여 전이병소가 유의하게 '높은 발현'을 보였다.

이상의 연구 결과로 미루어 CD133의 발현은 두경부 편평세포암종의 예후를 예측하는 표지자로 어느 정도 유용하다고 생각되며 두경부 편평세포암종의 암줄기세포 표지자로서 가치가 있어 향후 효과적인 항암치료법 개발에 기초자료로 활용될 수 있을 것으로 생각된다.

참 고 문 헌

- Al Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernandez A, Morrison SJ, Clarke MF. Prospective identification of of tumorigenic breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100:3983-8.
- Beier D, Hau P, Proescholdt M, Lohmeier A, Wischhusen J, Oefner PJ, Aigner L, Brawanski A, Bogdahn U, Beier CP. CD133(+) and CD133(-) glioblastoma-derived cancer stem cells show differential growth characteristics and molecular profiles. *Cancer Res* 2007;67:4010-5.
- Beier D, Wischhusen J, Dietmaier W, Hau P, Proescholdt M, Brawanski A, Bogdahn U, Beier CP. CD133 expression and cancer stem cells predict prognosis in high-grade oligodendroglial tumors. *Brain Pathol* 2008;18:370-7.
- Bonnet D, Dick JE. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nature Med* 1997;3:730-7.
- Bussolati B, Bruno S, Grange C, Buttiglieri S, Deregibus MC, Cantino D, Camussi G. Isolation of renal progenitor cells from adult human kidney. *Am J Pathol* 2005;166:545-55.
- Eramo A, Lotti F, Sette G, Pilozzi E, Biffoni M, Di Virgilio A, Conticello C, Ruco L, Peschle C, De Maria R. Identification and expansion of the tumorigenic lung cancer stem cell population. *Cell Death Differ* 2008;15(3):504-14.
- Hamburger AW, Salmon SE. Primary bioassay of human tumour stem cells. *Science* 1977;197(4302):461-3.

- Hermann PC, Huber SL, Herrler T, Aicher A, Ellwart JW, Guba M, Bruns CJ, Heeschen C. Distinct populations of cancer stem cells determine tumor growth and metastatic activity in human pancreatic cancer. *Cell Stem Cell* 2007;1:313-23.
- Kang SK, Kim CH, Kim SK, Choi BR, Hwang KW, Cho MK. Expression of CD133, CD24, CD44 in cutaneous malignant tumors. *Korean J Dermatol* 2008;46(6):742-8.
- Klein WM, Wu BP, Zhao S, Wu H, Klein-Szanto AJ, Tahan SR. Increased expression of stem cell markers in malignant melanoma. *Mod Pathol* 2007;20:102-7.
- Li C, Heidt DG, Dalerba P, Burant CF, Zhang L, Adsay V, Wicha M, Clarke MF, Simeone DM. Identification of pancreatic cancer stem cell. *Cancer Res* 2007;67:1030-7.
- Ma YH, Mentlein R, Knerlich F, Kruse ML, Mehdorn HM, Held-Feindt J. Expression of stem cell markers in human astrocytomas of different WHO grades. *J Neurooncol* 2008;86:31-45.
- Maeda S, Shinchu H, Kurahara H, Mataka Y, Maemura K, Sato M, Natsugoe S, Aikou T, Takao S. CD133 expression is correlated with lymph node metastasis and vascular endothelial growth factor-C expression in pancreatic cancer. *Br J Cancer* 2008;98:1389-97.
- Mangiola A, Lama G, Giannitelli C, De Bonis P, Anile C, Lauriola L, La Torre G, Sabatino G, Maira G, Jhanwar-Uniyal M, Sica G. Stem cell marker nestin and c-Jun NH2-terminal kinases in tumor and peritumor areas of glioblastoma multiforme: possible prognostic implications. *Clin Cancer Res* 2007;13:6970-7.
- Matsui W, Huff CA, Wang Q, Malehorn MT, Barber J, Tanhehco Y, Smith BD, Civin CI, Jones RJ. Characterization of clonogenic multiple myeloma cells. *Blood* 2004;103:2332-6.

- Mehra N, Penning M, Maas J, Beerepoot LV, van Daal N, van Gils CH, Giles RH, Voest EE. Progenitor marker CD133 mRNA is elevated in peripheral blood of cancer patients with bone metastases. *Clin Cancer Res* 2006;12:4859-66.
- Mohan A, Kandalam M, Ramkumar HL, Gopal L, Krishnakumar S. Stem cell markers: ABCG2 and MCM2 expression in retinoblastoma. *Br J Ophthalmol* 2006;90:889-93.
- O'Brien CA, Pollett A, Gallinger S, Dick JE. A human colon cancer cell capable of initiating tumour growth in immunodeficient mice. *Nature* 2007;445:106-110.
- Prince ME, Sivanandan R, Kaczorowski A, Wolf GT, Kaplan MJ, Dalerba P, Weissman IL, Clarke MF, Ailles LE. Identification of a subpopulation of cells with cancer stem cell properties in head and neck squamous cell carcinoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007;104:973-8.
- Ricci-Vitiani L, Lombardi DG, Pilozzi E, Biffoni M, Todaro M, Peschle C, De Maria R. Identification and expansion of human colon-cancer-initiating cells. *Nature* 2007;445:111-5.
- Richardson GD, Robson CN, Lang SH, Neal DE, Maitland NJ, Collins AT. CD133, a novel marker for human prostatic epithelial stem cells. *J Cell Sci* 2004;117:3539-45.
- Bao S, Wu Q, McLendon RE, Hao Y, Shi Q, Hjelmeland AB, Dewhirst MW, Bigner DD, Rich JN. Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response. *Nature* 2006;444:756-60.
- Shmelkov SV, Butler JM, Hooper AT, Hormigo A, Kushner J, Milde T, St Clair R, Baljevic M, White I, Jin DK, Chadburn A, Murphy AJ, Valenzuela DM, Gale NW, Thurston G, Yancopoulos GD, D'Angelica M, Kemeny N, Lyden D, Rafii S. CD133 expression is not restricted to stem cells, and both CD133⁺ and CD133⁻metastatic colon cancer cells initiate tumors. *J Clin Invest* 2008;118:2111-20.

- Singh SK, Clarke ID, Terasaki M, Bonn VE, Hawkins C, Squire J, Dirks PB. Identification of a cancer stem cell in human brain tumors. *Cancer Res* 2003;63:5821-8.
- Singh SK, Hawkins C, Clarke ID, Squire JA, Bayani J, Hide T, Henkelman RM, Cusimano MD, Dirks PB. Identification of human brain tumour initiating cells. *Nature* 2004;432:396-401.
- Schatton T, Murphy GF, Frank NY, Yamaura K, Waaga-Gasser AM, Gasser M, Zhan Q, Jordan S, Duncan LM, Weishaupt C, Fuhlbrigge RC, Kupper TS, Sayegh MH, Frank MH. Identification of cells initiating human melanomas. *Nature* 2008;451:345-9.
- Uchida N, Buck DW, He D, Reitsma MJ, Masek M, Phan TV, Tsukamoto AS, Gage FH, Weissman IL. Direct isolation of human central nervous system stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;97:14720-5.
- Weinberg RA. *The biology of cancer*. Garland Sci Press 2005;11:399-462.
- Yin AH, Miraglia S, Zanjani ED, Almeida-Porada G, Ogawa M, Leary AG, Olweus J, Kearney J, Buck DW. AC133, a novel marker for human hematopoietic stem and progenitor cells. *Blood* 1997;90:5002-12.
- Zhou L, Wei X, Cheng L, Tian J, Jiang JJ. CD133, one of the markers of cancer stem cells in Hep-2 cell line. *Laryngoscope* 117:455-60, 2007.

Table 1. Characteristics of 118 patients with head and neck squamous cell carcinoma(%).

Characteristic	No. of patients(%)
Case No.	118
Age(yrs.)	
Mean	59.8
Range	26-84
Gender	
Male	105(89.0)
Female	13(11.0)
Tumor stage	
Early(I, II)	40(33.9)
I	17
II	23
Advanced(III, IV)	78(66.1)
III	34
IV	44
Tumor site	
Oral cavity	20(16.9)
Pharynx	41(34.8)
Larynx	57(48.3)
Lymph node metastasis	
Yes	78(66.1)
No	40(33.9)
Differentiation	
W/D	47(39.8)
M/D	64(54.2)
P/D	7(5.9)

* W/D : well differentiated
M/D : moderately differentiated
P/D : poorly differentiated

Table 2. Comparison of CD133 expression in head and neck squamous cell carcinoma according to the primary tumor site, gender, tumor stage and differentiation (%)

Group	CD133 expression		p value
	low (n=56)	high (n=62)	
Site			
Oral cavity (n=20)	10(50.0)	10(50.0)	
Pharynx (n=41)	17(41.5)	24(58.5)	
Larynx (n=57)	29(50.9)	28(49.1)	
Gender			
Male (n=105)	50(47.6)	55(52.4)	
Female (n=13)	6(46.2)	7(53.8)	
Tumor stage			
Early (I, II) (n=40)	25(62.5)	15(37.5)	p<0.05
Advanced (III, IV) (n=78)	31(39.7)	47(60.3)	
Differentiation			
W/D (n=47)	32(68.1)	15(31.9)	p<0.05
M/D (n=64)	22(34.4)	42(65.6)	
P/D (n=7)	2(28.6)	5(71.4)	

* W/D : well differentiated
M/D : moderately differentiated
P/D : poorly differentiated

Table 3. Comparison of CD133 expression in the primary tumor site according to the nodal status in head and neck squamous cell carcinoma (%)

Group	CD133 expression		p value
	low (n=56)	high (n=62)	
LN mets(+)(n=78)	27(34.6)	51(65.4)	<0.05
LN mets(-)(n=40)	29(72.5)	11(27.5)	

* LN mets(+): Group of lymph node metastasis
LN mets(-): Group of no lymph node metastasis

Table 4. Comparison of CD133 expression between primary tumor site and metastatic lymph node in node positive head and neck squamous cell carcinoma (%)

Group	CD133 expression		p value
	low (n=33)	high (n=123)	
Primary site(n=78)	27(34.6)	51(65.4)	<0.01
Mets LN(n=78)	6(7.7)	72(92.3)	

* Mets LN: metastatic lymph node

논문 사진부도 I

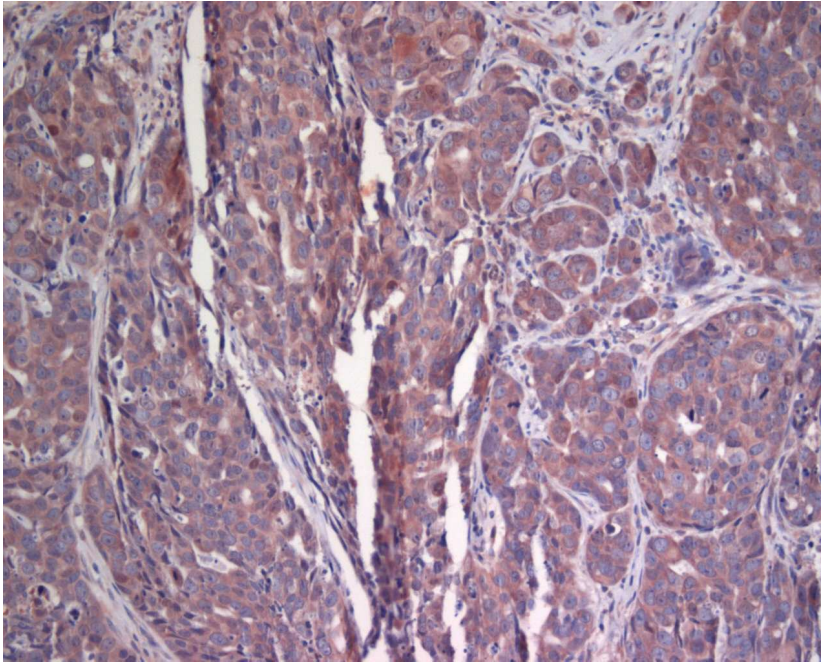


Fig. 1. Immunohistochemical staining for CD133 in primary head and neck squamous cell carcinoma with lymph node metastasis. Poorly differentiated squamous cell carcinoma showed 'high expression' of CD133 in the cytoplasm. Polymer HRP detection system, counterstained by hematoxylin. x100.

논문 사진부도 II

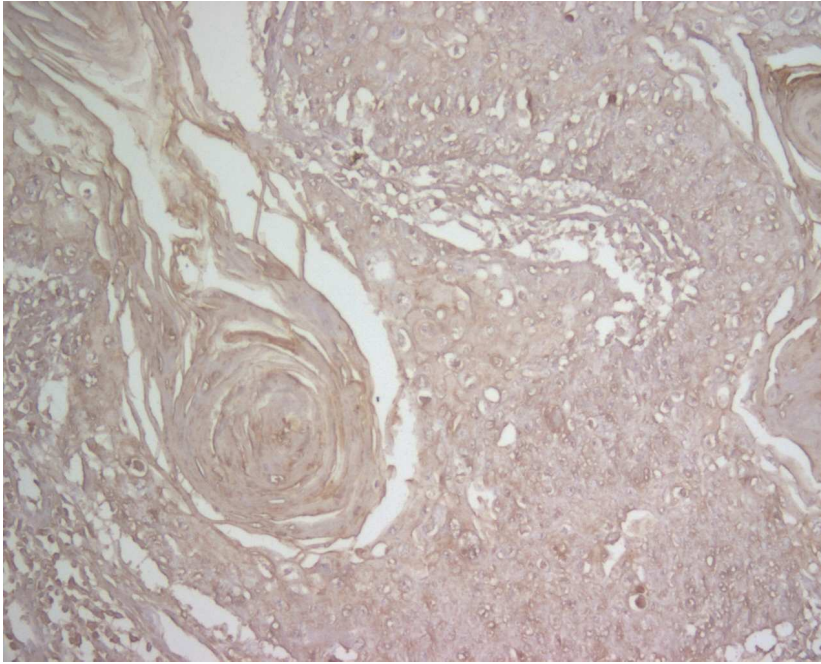


Fig. 2. Immunohistochemical staining for CD133 in primary head and neck squamous cell carcinoma without lymph node metastasis. Well differentiated squamous cell carcinoma showed 'high expression' of CD133 in the cytoplasm. Polymer HRP detection system, counterstained by hematoxylin. x100.

논문 사진부도 III

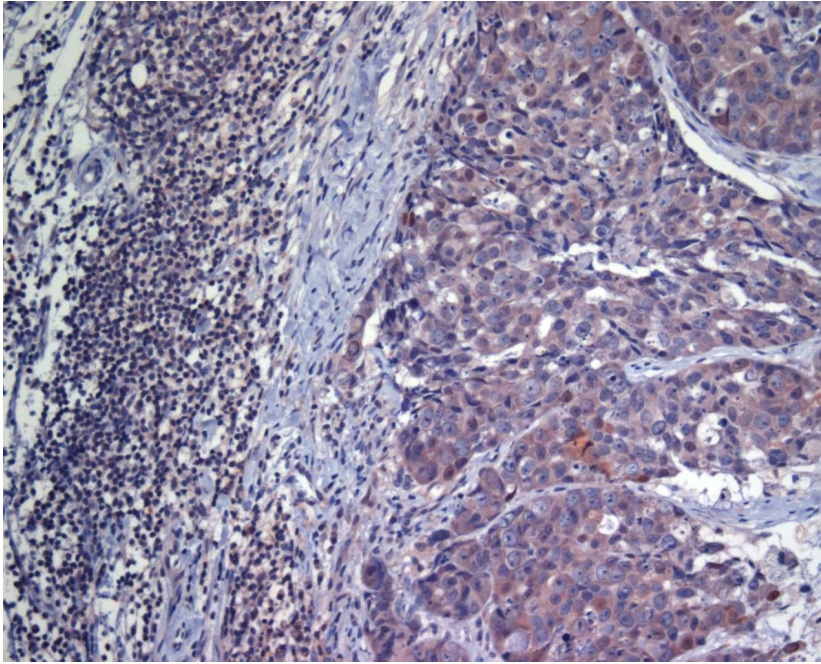


Fig. 3. Immunohistochemical staining for CD133 in metastatic squamous cell carcinoma of the cervical lymph node. Poorly differentiated metastatic squamous cell carcinoma showed 'high expression' of CD133 in the cytoplasm. Polymer HRP detection system, counterstained by hematoxylin. x100.